

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. Anton Mayr

Biologische Eigenschaften von Salmonella-Stämmen, die aus
Schlachtrindern und Schlachtkälbern im Raum Süddeutschland
isoliert wurden.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johann Fischer
aus
Kötzing
München, 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Kotter

Tag der Promotion: 30. Juli 1982



DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. <u>Vorkommen und Verbreitung entero- toxinbildender Enterobakterien</u>	2
2.1.1. <u>Escherichia coli</u>	2
2.1.2. <u>Salmonella</u>	5
2.1.3. <u>Vibrio</u>	5
2.1.4. <u>Sonstige Enterobakterien</u>	6
2.2. <u>Nachweisverfahren für enterotoxin- bildende Bakterien</u>	9
2.2.1. <u>In vivo-Tests</u>	9
2.2.2. <u>In vitro-Tests</u>	12
2.3. <u>Struktur und Wirkungsweise der Enterotoxine</u>	15
2.3.1. <u>Hitzelabiles Enterotoxin</u>	15
2.3.2. <u>Hitzestabiles Enterotoxin</u>	18
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
3.1. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	25
3.1.1. <u>Herkunft der Salmonella-Stämme</u>	25
3.1.2. <u>Anzüchtung und Isolierung</u>	25
3.1.3. <u>Differenzierung</u>	25
3.1.4. <u>Verfahren der Überprüfung des Ver- haltens gegenüber Antibiotika</u>	26

	Seite
3.1.5. <u>Nachweis der Enterotoxizität</u>	27
<u>bzw. Enterotoxinbildung</u>	
3.1.5.1. <u>Darmligaturtest</u>	27
3.1.5.2. <u>Babymaustest</u>	27
3.1.5.3. <u>Verozelltest</u>	28
3.1.6. <u>Hämagglutination</u>	28
3.2. <u>Ergebnisse</u>	30
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	40
5. ZUSAMMENFASSUNG	44
<u>Summary</u>	45
6. LITERATURVERZEICHNIS	
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Aus den Statistiken vieler diagnostischer Untersuchungen ist bekannt, daß Schlachtrinder und Schlachtkälber häufig Salmonellenträger sind. Diese Untersuchungen beschränkten sich meist nur auf die biochemische und serologische Differenzierung und zahlenmäßige Erfassung der Salmonella-Stämme, während auf die biologischen Eigenschaften der Salmonellen oft nicht oder nur wenig eingegangen wurde. Ergebnisse an ausgewählten Salmonella-Stämmen haben aber gezeigt, daß unter diesen auch Unterschiede in den biologischen Eigenschaften bestehen können. Von den verschiedenen biologischen Eigenschaften stehen vor allem die Fähigkeiten zur Enterotoxinbildung und Anheftung, die als Pathogenitätsfaktoren bei anderen Enterobakterien bekannt sind, und die Resistenzbildung im Mittelpunkt des Interesses. In der vorliegenden Arbeit wurden 90 verschiedene Salmonella-Stämme, die im Sommer und Herbst 1980 am Schlachthof München bei Rindern und Kälbern isoliert wurden, auf Enterotoxinbildung und Vorhandensein von Anheftungsmechanismen geprüft, und die bei ihnen vorkommenden Resistenzeigenschaften bestimmt.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Vorkommen und Verbreitung enterotoxinbildender Enterobakterien

Bereits im Jahre 1956 vermuteten De et al. und später auch andere Wissenschaftler Enterotoxine als Virulenzfaktoren bei aus Durchfallproben isolierten *E.coli*-Keimen, ohne jedoch deren Existenz beweisen zu können. Erst 1967 gelang es Smith und Halls die Enterotoxinbildung bei *E.coli*-Stämmen von Haustieren mit schwerer Diarrhoe nachzuweisen. Seit dieser Zeit wurden Enterotoxine bei vielen Bakterien entdeckt.

Enterotoxinbildende Stämme sind heute bei folgenden Bakterien bekannt: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Proteus morgani*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* und *Aeromonas sobria* (siehe Tabelle 1). Weiterhin sind Enterotoxinbildner auch unter Stämmen von "Nicht-Enterobacteriaceae" bekannt so z.B. bei *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter anitratus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Auf diese Stämme soll aber in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Mit Ausnahme der ausschließlich menschenpathogenen Erreger von Cholera und Ruhr sind die übrigen oben angeführten Keime bei Mensch und Tier im Zuge durchfallartiger Erkrankungen verschiedenen Schweregrades häufig anzutreffen.

2.1.1. Escherichia coli

Enterotoxinbildende *E.coli* (ETEC)-Stämme spielen eine große Rolle unter den Aufzuchtkrankheiten der Tiere. ETEC-Stämme wurden aus dem Kot oder Darminhalt von an Durchfall erkrankten Kälbern (Myers et al., 1975; Myers und Guinée, 1976; Sivaswamy und Cyles, 1976; Kapitany et al.,

1979 b; Acosta-Martinez et al., 1980), Ferkeln (Pesti, 1979; Kapitany et al., 1979 b) und Lämmern (Smith und Gyles, 1970) isoliert. Josse et al. (1980) berichteten über die Isolierung von ETEC-Stämmen aus Hunden mit akuter Diarrhoe und Pandey et al. (1979) von ETEC-Stämmen bei Geflügeldiarrhoen.

Auch beim Mensch spielen ETEC-Stämme als Erreger von Darm-erkrankungen eine bedeutende Rolle. Hier sind vor allem die Kleinkinder der Entwicklungsländer betroffen, bei denen Diarrhoe-Erkrankungen bis zum 5. Lebensjahr als Todesursache an erster Stelle stehen. Wadström (1978) verglich in einer Studie das Auftreten von ETEC-Stämmen bei Kindern mit akuter Diarrhoe aus Schweden und Äthiopien. Während bei den schwedischen Kindern kein enterotoxischer Keim festgestellt werden konnte, waren bei den äthiopischen Kindern 38 % der isolierten E.coli-Stämme Enterotoxinbildner. Ein altersbezogener Überblick bezüglich des ETEC-Vorkommens bei Patienten in Bangladesh über einen Zeitraum von 2 Jahren zeigte, daß ETEC-Stämme bei Kindern unter 2 Jahren nach den Rota-Viren, und bei Kindern zwischen 2 und 9 Jahren nach *Vibrio cholerae* die am häufigsten isolierten Keime waren. Bei den erwachsenen Patienten lagen die ETEC-Stämme an der Spitze der nachgewiesenen Krankheitserreger. Die meisten dieser Stämme produzierten nur hitzestabiles (ST) und ein kleinerer Teil hitzelabiles und hitzestabiles (LT + ST) oder nur hitzelabiles (LT) Enterotoxin (Black et al., 1980).

Aber auch in den Zivilisationsländern konnten humane, enterotoxinbildende E.coli-Stämme mehrmals als Ursache von Diarrhoeausbrüchen auf Säuglingsstationen bestimmt werden (Gorbach und Khurana, 1972; Guerrant et al., 1976; Gurwith und Williams, 1977; Henriqueta et al., 1979).

ETEC-Stämme sind ebenso in erheblichem Maße für das Auftreten von Reisediarrhoen verantwortlich. Derartige Stämme führten bei 30 % bis 60 % der Reisenden aus Zivilisationsländern innerhalb der ersten 3 Wochen ihres Aufenthaltes in einem Entwicklungsland zu Durchfallserkrankungen, wobei LT- als auch ST-produzierende ETEC-Stämme nachgewiesen werden konnten (Sack, 1978; Merson et al., 1976 und 1980;

Stieglitz et al., 1980).

Bei ETEC-Stämmen von Mensch und Ferkel sind bestimmte O- und K-Antigene in hohem Maße mit der Anwesenheit der plasmidbestimmten Fähigkeit der Enterotoxinbildung verbunden. Nach Bockemühl et al. (1979) kann daher die serologische Differenzierung einen Hinweis auf die Enterotoxinbildung bestimmter E.coli-Stämme geben. Beim Schwein besitzen ETEC-Stämme spezifische Fimbrienantigene (K 88 und P 987) (Guinée und Jansen, 1979). Bei bovinen Stämmen besteht eine Korrelation der Enterotoxinbildung mit dem Anheftungsfaktor K 99 und bei humanen Stämmen mit CF 10407 (Myers und Guinée, 1976; Guinée et al., 1979; Smith und Williams, 1977; Renault et al., 1978; Moon et al., 1980 und Olsson und Söderlind, 1980). Söderlind und Möllby (1979) fanden in vergleichenden Untersuchungen, daß z.B. 53 % der Stämme, die beim Ferkel Durchfall hervorriefen zur O-Gruppe O 148 gehörten, und daß hiervon 61 % Enterotoxin bildeten und davon wiederum 56 % das K 88-Antigen besaßen. Dagegen hatten nur 3 % der von gesunden Ferkeln stammenden E.coli-Stämme eine dieser Eigenschaften inne. Evans et al. (1977) untersuchten E.coli-Stämme von Touristen, die in Mexiko an einer Reisediarrhoe erkrankt waren und stellten fest, daß die meisten enterotoxischen Stämme den Serotypen O 6:H 16, O 6:H⁻, O 25:H 42, O 20:H⁻ angehörten. Merson et al. (1976) und Sack (1980) wiesen nach, daß die Enterotoxinbildner unter den humanen ETEC-Stämmen hauptsächlich bei den Serotypen O 6:K 15:H 16, O 8:K 40:H 9, O 78:H 11, O 78:H 12, O 25:K 7:H 42, O 15:H 11, O 115:H 51 und O 128:H (variabel) zu finden waren.

Als Darmbewohner hat E.coli ubiquitäre Verbreitungsmöglichkeiten, weswegen sich einige Untersuchungen auch mit der Verbreitung von ETEC in der unbelebten Umwelt befaßten. Bettelheim et al. (1980) isolierten einen LT-positiven ETEC-Stamm aus Butter, Sack et al. (1977) fanden bei ca. 8 % von insgesamt 240 E.coli-Isolaten aus vom Tier stammenden Lebensmitteln (Käse, Fleisch- und Wurstherzeugnisse,

Meerestiere) ETEC-Stämme, die LT und/oder ST bildeten und schlossen daraus, daß derartige Lebensmittel als Überträger fungieren können. Diese Forschergruppe vermutete sogar einen weit höheren Prozentsatz an Enterotoxinbildnern, da infolge der Subkultivierung der untersuchten Stämme die plasmidgebundene Fähigkeit der Enterotoxinbildung verloren gegangen sein könnte.

2.1.2 Salmonella

Über eine enterotoxische Wirkung von Salmonella-Stämmen berichteten erstmals Taylor und Wilkins (1961), sowie später Giannella et al. (1973), Sakazaki et al. (1974) und Koupal und Deibel (1975). Sedlock und Deibel (1978) kamen nach Austestung mehrerer Stämme verschiedener Salmonella-Species von Humanpatienten und Lebensmitteln zu dem Schluß, daß bei Salmonellen die Enterotoxinproduktion in sehr hohem Maße vertreten ist. Sedlock et al. (1978) wiesen bei Salmonella typhimurium-Stämmen und Sandefur und Peterson (1976) bei unterschiedlichen Salmonella-Species die Fähigkeit zur Bildung von hitzestabilem und hitzelabilem Enterotoxin nach. Jiwa (1981) testete insgesamt 68 von Menschen, Tieren und Lebensmitteln stammende Salmonella-Isolate, die 39 Serotypen angehörten, und fand eine offensichtlich obligat auftretende Enterotoxizität bei Salmonellen.

2.1.3. Vibrio

Das Choleratoxin, ein hitzelabiles Enterotoxin, ist am längsten bekannt. Als Modellkeim stand *V.cholerae* im Mittelpunkt der meisten die Enterotoxizität betreffende Studien, und war Anlaß zur Entwicklung letztlich aller derzeit gebräuchlichen Modelle für den Enterotoxinnachweis. Heute spielt *V.cholerae* nur noch in wenigen Entwicklungsländern eine Rolle; in den Industrieländern tritt der Erreger nur sporadisch infolge Einschleppung auf (Gsell, 1976). Bei kranken Kindern in Bangladesh stand dieser Erreger an 1. Stelle, bei den Erwachsenen war er nach

ETEC am häufigsten vertreten (Black et al., 1980). Honda et al. (1976) entdeckten auch bei *Vibrio parahaemolyticus* ein hitzelabiles Enterotoxin, das ebenfalls für Durchfallerscheinungen verantwortlich gemacht werden konnte.

2.1.4. Sonstige Enterobakterien

Das Genus *Shigella* hat als Erreger schwerer seuchenartiger Diarrhoe-Erkrankungen nur beim Mensch Bedeutung. Keusch et al. (1972) wiesen ein hitzelabiles Enterotoxin bei *Shigella dysenteriae* 1 nach, was in der Folgezeit durch Keusch und Donata (1975), McIver et al. (1975) und Takeda et al. (1977) bestätigt werden konnte.

Erst relativ spät wurden die übrigen Enterobakterien auf Enterotoxine untersucht. Die Gründe hierfür waren ihre umstrittene pathogene Bedeutung als Diarrhoe-Erreger und das Fehlen geeigneter Testmodelle für routinemäßige Untersuchungen auf das Vorhandensein einer Enterotoxinbildung. Klipstein und Schenk (1975) wiesen bei an Diarrhoe erkrankten Puertorikanern und Gurwith und Williams (1977) bei kranken Kleinkindern hitzestabile und hitzelabile Enterotoxine bei *Klebsiella pneumoniae*- und *Enterobacter cloacae*-Stämmen nach. Stämme derselben Species, die von Klipstein et al. (1977) aus dem Harntrakt von Menschen gemäßigter Klimazonen isoliert wurden, waren zu 46 % enterotoxisch, zeigten aber im Vergleich zu entsprechenden Stämmen aus schweren Diarrhoen eine millionenfach geringere biologische Wirkung. Da es bisher keine Kriterien für die Toxinmenge gibt, die in vivo gebildet werden muß um klinisch in Erscheinung zu treten, bleibt deren pathologische Bedeutung ungeklärt. Guerrant et al. (1976) bestimmten im Stuhl von Säuglingen mit milder wässriger Diarrhoe unter anderem enterotoxinbildende Stämme von *Klebsiella* und *Citrobacter*. Wadström (1978) untersuchte Stuhlproben von an Durchfall erkrankten äthiopischen Kindern und stellte fest, daß sich unter den entdeckten Enterotoxinbildnern 15 % *Klebsiella*-, 12 % *Enterobacter*-, 11 % *Citrobacter*-, 7 % *Proteus*- und 2 % *Serratia*-Stämme befanden. Bei schwedischen Kindern

dagegen ließ sich nur bei 2 Stämmen von *Proteus morgani* und *Hafnia alvei* und nur einem Stamm von *Citrobacter freundii* eine Produktion hitzelabilen Enterotoxins aufweisen. Bäck et al. (1980) stellten im Stuhl kranker äthiopischer Kinder hitzelabiles und hitzestabiles Enterotoxin bildende Stämme bei *Enterobacter cloacae* und *Proteus morgani* fest, während sie bei Stämmen von *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Serratia marcescens* nur die Bildung von hitzelelabilem Enterotoxin demonstrieren konnten.

Pai et al. (1978), Boyce et al. (1979) und Robins-Brown et al. (1979) entdeckten unter *Y. enterocolitica*-Stämmen vom Mensch eine hohe Frequenz an Enterotoxizität (ST), wobei diese Fähigkeit beim Serotyp O3/Biotyp 4 auffallend oft im Zusammenhang mit dem Vermögen der Zell-Invasivität auftrat. Alle untersuchten Umweltstämme waren dagegen nicht invasiv (Kapperud, 1980 b). *Yersinia enterocolitica*-Stämme der Serogruppe O 28 aus Wasserproben und kleinen Nagetieren bildeten nicht nur bei 22°C sondern auch bei 37°C und bei 4°C ein Enterotoxin (Kapperud, 1980 a-c; Kapperud und Lange-land, 1981). Als Hauptinfektionsquelle für den Menschen verdächtigten Olsson et al., (1980) das Schwein, bei dem sie *Y. enterocolitica*-Stämme (zu 37 % Enterotoxinbildner) häufig feststellten.

Bei *Aeromonas hydrophila* Stämmen die von an Durchfall erkrankten äthiopischen Kindern, indischen Patienten und Wasserproben isoliert wurden, konnten im Darmligaturtest, dem Hautpermeabilitätstest beim Kaninchen und dem Zellgewebetest hitzestabile und hitzelabile Enterotoxine nachgewiesen werden (Ljungh et al., 1977; Sanyal et al., 1975). Cumberbatch et al. (1979) hielten dagegen das von *Aeromonas hydrophila*-Stämmen gebildete Cytotoxin, das nach eigenen Untersuchungen bei 69 % ihrer Stämme auftrat, für die Diarrhoe und die positive Wirkung im Zellkulturtest verantwortlich.

Boulanger et al. (1977) isolierten 21 *Aeromonas*-Stämme von der Haut und aus dem Darm von Fischen. Dabei wurden

A.socria-Stämme nur bei gesunden, A.hydrophila-Stämme bei gesunden und kranken Fischen identifiziert. Alle A.socria- und 4 A.hydrophila-Stämme zeigten positive Reaktion im Babymaustest und im Kaninchen-Darmligaturtest.

2.2. Nachweisverfahren für enterotoxinbildende Bakterien

Die bisher für den Nachweis von Enterotoxinen beschriebenen Tests sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

2.2.1. In vivo-Tests

Die bekannteste Nachweismethode ist der Darmligaturtest (DLT). Der DLT beim Kaninchen wurde schon 1915 von Violle und Crendiropoulo für den Nachweis von Cholera-enterotoxin beschrieben. De und Chatterje (1953) übernahmen diese Technik und benutzten sie ab den 50er Jahren in großem Umfang zur Demonstration der Enterotoxizität verschiedener Keime. Für den DLT werden Versuchstiere (Kaninchen, Ferkel, Kälber usw; s.unten) laparotomiert und das Jejunum in Segmente durch Ligaturen unterteilt. In diese Segmente wird zellfreier Kulturüberstand oder lebende Zellsuspension injiziert. Nach 18-stündiger Inkubation werden die Tiere getötet und der Dünndarm herauspräpariert. Zur Auswertung setzt man die in den Testsegmenten angesammelte Flüssigkeitsmenge in Beziehung zur jeweiligen Segmentlänge. Zur Steigerung der Sensibilität empfehlen manche Autoren vor Anbringung der Ligaturen den Darm mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (bei *Pseudomonas*), mit Phosphatpufferlösung (bei ETEC) oder mit einer macolytischen Waschlösung (bei *Salmonella*) zu spülen (Kubota und Liu, 1971; Evans et al., 1973a; Sedlock und Deibel, 1978). Der DLT wird neben dem Kaninchen (Leicht et al., 1966; Moon et al., 1970; Pai und Mors, 1978, und zahlreiche andere) auch bei anderen Tierarten wie Ferkel (Smith und Halls, 1967 b; Gyles und Barnum, 1969; Smith und Gyles, 1970; Baljer und Barrett, 1979), Kalb (Myers et al., 1975; Myers und Guinée, 1976; Guinée und Jansen, 1979), Lamm (Smith und Halls, 1967 a) und Hund (Sack und Carpenter, 1969; Nalin et al., 1974) durchgeführt. Das homologe System ist jedoch stets am empfindlichsten.

Der Babymaustest (BMT), von Dean et al. (1972) entwickelt und durch Giannella (1976) verbessert, ist das am häufigsten

verwendete Modellsystem zum Nachweis des hitzestabilen Enterotoxins. Bei diesem Test wird 2-3 Tage alten Mäusen 0,1 ml Kulturüberstand, der mit einer 2 % igen Pontamin sky blue-Farblösung (2 Tropfen/ml) oder mit 0,001 % igem Evans-Blau (Takeda et al., 1981) versetzt ist, in den milchgefüllten Magen percutan injiziert (Dean et al., 1972), oder oral über eine Magensonde verabreicht (Burke et al., 1982). In Abhängigkeit von der zu prüfenden Bakterienart werden die Tiere nach einer bestimmten Zeit getötet und der gesamte Darm ohne Magen entnommen. Bei Stämmen von *E.coli* erfolgt die Tötung der Mäuse nach 3-4 Stunden (Dean et al., 1972; Giannella, 1976), bei *Yersinia enterocolitica* nach maximal 2 Stunden (Robins-Brown et al., 1979; Nunes und Ricciardi, 1981) und bei *Salmonella* nach 2,5 Stunden (Koupal und Deibel, 1975). Tiere, bei denen sich Farbstoff außerhalb des Darmtraktes oder allein im Magen findet, werden aus dem Test genommen. Für die Beurteilung ist das Verhältnis Darmgewicht zu restlichem Körpergewicht der jeweiligen Tiergruppe ausschlaggebend. Über die als positiv zu wertenden Indizes gibt es unterschiedliche Angaben. Dean et al. (1972) betrachteten einen Index kleiner 0,070 als negativ, 0,070 - 0,090 als fraglich positiv und größer 0,090 als stark positiv. Für Rudoy und Nelson (1975) galt schon ein Index größer 0,070 und für Whipp et al. (1975) ein Index größer 0,085 als positiv. Bei den meisten Berichten wurde jedoch ein Index größer 0,090 als positiv erachtet (Alderete und Robertson, 1978; Guinée und Jansen, 1979; Guerrant et al., 1980; Takeda et al., 1981).

Moon et al., (1979) stellten bei 2-8 Tage alten Babymäusen fest, daß eine Erhöhung der Umgebungstemperatur während der Toxineinwirkungszeit von üblicherweise 25°C auf 37°C bei den Tieren eine Diarrhoe begünstigte. Aus diesem Grund schlugen sie vor, die Tiere nach Verabreichung der Toxinpräparation in einen mit weißem Papier ausgelegten Käfig zu setzen und nach 4 Stunden optisch die Menge des abgesetzten, blaugefärbten Kotes zu beurteilen. Je nach Stärke des Durchfalls ergab sich so ein Index von

0 (keine Diarrhoe), 1+ (1 Farbfleck) bis 4+ (ausgedehnte Farbflecke über den größten Teil des Papierses zeigten profusen Durchfall an).

So wertvoll der BMT zur Entdeckung hitzestabilen Enterotoxins auch ist, bei bestimmten Formen, wie dem Methanol-unlöslichen, hitzestabilen Enterotoxin (STa) von ETEC-Stämmen des Schweines (pETEC) und bei gewissen ETEC-Stämmen des Menschen (hETEC) versagt er, und verliert damit einen Teil seiner diagnostischen Bedeutung (Whipp et al., 1975; Burgess et al., 1978; Olsson und Söderlind, 1980; Nalin et al., 1978).

Auch das BMT-Modell wurde auf andere Tierarten übertragen. Das Babykaninchen wurde für den Nachweis von ETEC-Stämmen bei Säuglingsdiarrhoeen (Gorbach und Khurana, 1972), und Babyratten und -hamster zum Nachweis von Choleratoxin (Takeda et al., 1978) verwendet.

Die in vivo Perfusion des Rattenjejunums (RPT) mit halbgereinigten Toxinpräparationen von in Tryptic soy broth (TSB) oder Soy broth (SB) gezüchteten Kulturen ist ein anderer, empfindlicher quantitativer Test für Enterotoxine. Klipstein et al., (1975; 1976), Klipstein und Engert (1976 a, b) und Klipstein et al. (1977; 1979) verwendeten diesen Test bei coliformen Bakterienstämmen, deren Enterotoxizität zum Teil nur mit diesem Testverfahren nachgewiesen werden konnte. Im einzelnen werden bei diesem Test 150-200 g schwere, narkotisierte Ratten tracheotomiert und laparotomiert. Nach Spülung eines 20 cm langen Jejunumsegmentes mit einer dem Blutplasma isoosmotischen Elektrolytlösung werden die zu prüfenden Präparationen mit Polyäthylenglycol als Markierungssubstanz versetzt, und nach einer 30-minütigen Einwirkungsperiode bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/min. durch das Darmsegment geschickt. Alle 30 Minuten wird eine Durchflußfraktion (insgesamt 6) gesammelt. Aus der Konzentrationsveränderung der Markierungssubstanz in den verschiedenen Fraktionen läßt sich die Stärke der Wassersekretion errechnen, und dabei die Toxin-

art bestimmen. Hitzestabiles Enterotoxin bewirkt bereits nach 30 min., hitzelabiles erst nach 60-90 min. eine Sekretion. Ein großer Vorteil dieses Tests ist die für beide Enterotoxinformen gleich gute, dosisabhängige Reaktion; ein Nachteil ist der relativ große Arbeitsaufwand.

Ein weiteres Modell für den Enterotoxinnachweis ist der Hautpermeabilitätstest (SPF-Test) bei Kaninchen und Meerschweinchen. Dabei werden pro Kulturfiltratprobe an 3 verschiedenen Hautstellen je 0,1 ml des Filtrates intracutan injiziert. Nach einer Stunde (bei hitzestabilen Faktoren) bzw. nach 18 Stunden (bei hitzelabilen Faktoren) wird eine 5 % ige Pontamin sky blue 6XB-Lösung 0,12 ml/100 g KG nach Craig (1965) oder 0,8 ml/kg KG nach Sandefur und Peterson (1976) i.v. gespritzt und etwa eine Stunde später die Reaktion abgelesen. Der Durchmesser der gefärbten Injektionsstelle soll in linearer Beziehung zum Logarithmus der Toxindosis stehen.

2.2.2. In vitro-Test

Seit der Entdeckung der Wirkungsweise des Choleratoxins und später des E.coli-LT's war man bestrebt die aufwendigen Tierversuche durch einfachere, vom Versuchstier unabhängige Nachweismethoden zu ersetzen. Donata et al. (1974) entdeckten, daß hitzelabiles Enterotoxin enthaltende Kulturfiltrate in Mousadrenalzellen (Y1-Zellen) über die Stimulierung der Adenylzyklase zu einer intrazellulären Anhäufung zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) führten. Die erhöhte cAMP-Konzentration verstärkte die Produktion von Δ^4 , 3-Ketosteroid, das ins Medium abgegeben wurde und dort spektrophotometrisch bestimmt werden konnte. Der umständliche Steroidnachweis wurde von Sack und Sack (1975) dadurch umgangen, daß sie allein die bei den Zellen auftretende zytopathogene Veränderung als beweisend für eine Enterotoxinwirkung betrachteten. Dieses Kriterium für die Anwesenheit hitzelabiler Enterotoxine übernahmen auch Guerrant et al. (1974) bei Hamsteroarialzellen (CHO-Zellen)

und Speirs et al. (1977) bei Verozellen. Zum Nachweis in der Zellkultur werden als Monolayer gezüchtete Gewebekulturen von Mausadrenal- und Verozellen, bzw. frisch sedimentierte Hamsteroarialzellen kurzzeitig (ca 5 min.) mit Kulturbouillon überschichtet, bzw. mit sterilem Kulturfiltrat versetzt. Nach wiederholtem Waschen der Monolayer mit Pufferlösung erfolgt eine Zugabe spezifischen Wachstumsmediums, dem 100 IE Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 50 µg Gentamycin/ml (Bäck et al., 1980) zur Wachstums- hemmung evt. zurückgebliebener Keime hinzugefügt wird. Nach 18-24 Stunden Bebrütung bei 37°C werden die Zellen auf zytopathische Effekte mikroskopisch untersucht. Ursprünglich trapezförmige Y1-Zellen zeigen im positiven Fall eine deutliche Abrundung, während CHO-Zellen spindelförmig und Verozellen vergrößert, abgerundet und mit zerbrechlich wirkenden filamentösen Fortsätzen versehen erscheinen.

Die Testmodelle zum indirekten Enterotoxinnachweis basieren alle auf der Antigenität hitzelabiler Enterotoxine. Gegen Choleratoxin bzw. E.coli-LT hergestellte Antisera sind für diese Nachweisverfahren unabdingbare Voraussetzung.

Der bedeutendste Nachweis dieser Art ist die von Evans und Evans (1977) beschriebene Passive Immnhämolyse (PIH). Dabei werden zunächst Schaf-Erythrozyten mit E.coli-LT sensibilisiert. Nach Zugabe von spezifischem Antitoxin und Komplement hämolysieren die Erythrozyten. Der Test erfolgt im Standard-Mikrotitersystem oder wird im Reagenzglas durchgeführt, wobei die Hämoglobin-Freisetzung spektrophotometrisch bestimmt wird. Die spektrophotometrische Methode vergrößert die Empfindlichkeit, Genauigkeit und Objektivität des PIH-Testes. Im Überstand der Reaktionsmischung gemessene Absorptionswerte von über 0,16 bei 420 nm Wellenlänge gelten nach Castro et al. (1980) als positiv. Da einige E.coli-Stämme hämolytisch sind und falsch-positive Ergebnisse liefern können sind gleichzeitig mitlaufende Kontrollansätze unbedingt erforderlich (Tsukamoto et al., 1980)

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wird zum Nachweis von Choleratoxin (Holmgren und Svennerholm, 1973) und E.coli-LT (Yolken et al., 1977) beschrieben und ist wesentlich empfindlicher als die Zellkulturtests und Tiermodelle.

Auf demselben Prinzip basiert der Radioimmunoassay (RIA), der jedoch anstelle von Enzymen radioaktives Material als Markierungssubstanz verwendet. (Greenberg et al., 1977; Ceska et al., 1978). Kürzlich gelang es Giannella et al. (1981) ebenso wie Frantz und Robertson (1981) auch E.coli-ST mit dem RIA nachzuweisen. Dazu war es zunächst notwendig das nicht antigene E.coli-ST für die Immunsérumherstellung an bovines Immunglobulin G (IgG) oder an Hämocyanin zu binden (Frantz und Robertson, 1981).

2.3. Struktur und Wirkungsweise der Enterotoxine

2.3.1. Hitzelabiles Enterotoxin

Das am eingehendsten erforschte Enterotoxin ist das Choleratoxin. Das Choleratoxin ist ein hitze- und säurelabiles, nicht dialysierbares, antigen wirksames, polymeres Protein mit einem Molekulargewicht (MG) von ca 84 000. Unter denaturierenden Verhältnissen dissoziiert dieses Protein in 2 als A- und B-Kette bezeichnete Untereinheiten. Die A-Kette (Choleraagen) hat ein MG von ca 28 000 und besteht wiederum aus 2 mit A₁ und A₂ ($\alpha + \gamma$) benannten Peptidketten (MG 24 000 bzw. 9 700), die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die B-Kette (Choleraagenoid) mit einem MG von ca 56 000 besteht ihrerseits aus 4-6 mit β bezeichneten Untereinheiten mit einem MG von je 9 700. Die Fähigkeit zur Enterotoxinbildung ist bei *Vibrio cholerae* chromosomal bestimmt (Vasil et al., 1975; van Heyningen, 1976; Clements und Finkelstein, 1978 b; Sack, 1980; Bockemühl, 1980).

Das hitzelabile Enterotoxin von *E.coli* (*E.coli*-LT) ist funktionell, strukturell und immunologisch (Clements und Finkelstein, 1978 b) in hohem Maße dem Choleratoxin ähnlich. Auch *E.coli*-LT wird durch Hitze, Säure und Pronase zerstört, ist nicht dialysierbar, wirkt antigen und besteht aus einer A- und einer B-Kette (Holmgren et al., 1973; Gyles, 1974; Clements und Finkelstein, 1978 a; Honda et al., 1981). Über das MG des *E.coli*-LT existieren jedoch äußerst unterschiedliche Angaben. Evans et al. (1974) stellten ein MG von ca. 20 000, Finkelstein et al. (1976) von ca 30 000, Dorner et al. (1976), wie auch Lariviere et al. (1973) und Jacks et al. (1973) von 100 000 und Schenkein et al. (1976) von etwa 180 000 - 200 000 fest. Den Grund für diese erheblichen MG-Unterschiede sahen Kunkel und Robertson (1979b) in den uneinheitlichen Wachstums- und LT-Gewinnungsbedingungen. Nachdem Gilligan und Robertson (1979) ein für die LT-Synthese (bei *E.coli*) geeignetes definiertes Medium entwickelt hatten, beschäftigten sich Kunkel und Robertson

(1979 a) mit den die LT-Freisetzung beeinflussenden Faktoren. Dabei stellten sie fest, daß die Höhe des MG's von der Länge der Bebrütungsdauer und der dabei vorherrschenden Temperatur abhing. Durch Behandlung mit Polymyxin B freigesetztes E.coli-LT ließ sich mittels Gelelektrophorese in mindestens 3 verschiedene Bruchstücke einteilen. 2 LT-Formen hatten ein MG von 22 000 bzw. 30 000 und waren ausschließlich im Lysat von Tauben-Erythrozyten aktiv. Eine 3. Form, die erst bei Bebrütungstemperaturen über 20°C (optimal bei 37°C) festzustellen war, hatte ein MG von 73 000, war aktiv im Lysat von Tauben-Erythrozyten und im Y1-Test, und dissoziierte nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat bei pH 7,0 in 2 Komponenten mit einem MG von 44 000 bzw. 30 000. Wurde das MG von aus der frühen logarithmischen Wachstumsphase stammendem E.coli-LT bestimmt, so erhielt man Werte unter 30 000. Hoekstra et al. (1976) beobachteten, daß ETEC-Stämme in späteren Wachstumsphasen bläschenartige Komplexe aus der äußeren Zellmembran freisetzen, die LT-Aktivität besaßen und ein extrem hohes MG (bis über 10⁶) aufwiesen. Eine weitere Erklärung für die teils sehr hohen MG-Werte von E.coli-LT-Präparationen ist die Neigung des Toxins Verbindungen mit Lipopolysacchariden und verschiedenen anderen Komponenten der äußeren Zellmembran einzugehen (Jacks et al., 1973; Lariviere et al., 1973).

Auch bei Salmonella-Stämmen fand man hitzelabiles Enterotoxin. Koupal und Deibel (1975) stellten im Überstand von in Synkase-Bouillon angezüchteten Salmonella-Stämmen ein Enterotoxin fest, das Gemeinsamkeiten mit dem hitzelabilen wie auch hitzestabilen E.coli-Enterotoxin aufwies. Dieses Enterotoxin war pH-stabil (pH1 - pH14), wurde erst ab Temperaturen über 75°C inaktiviert, war nicht dialysierbar und positiv im BMT. Sandefur und Peterson (1976) wiesen in Kulturfiltraten verschiedener Salmonella-Stämme mit dem SPF-Test einen verzögert wirksamen, hitzelabilen Permeabilitätsfaktor (DPF) nach, der auch positiv im CHO-Test war, und ein MG von ca 84 000 - 90 000 besaß. Sandefur und Peterson (1977) stellten eine Verwandtschaft

des teilweise gereinigten DPF's von *Salmonella* mit dem hitzelabilen Enterotoxin von *V.cholerae* und *E.coli* fest. Jiwa (1981) fand im Kulturüberstand von 68 verschiedenen *Salmonella*-Stämmen hitzelabiles Enterotoxin und vermutete deshalb ebenso wie Sedlock und Deibel (1978) eine bei *Salmonella*-Stämmen chromosomal bestimmte Enterotoxizität.

Auch bei Kulturfiltraten von *Shigella dysenteriae* 1-Stämmen gelang der Nachweis von hitzelabilem Enterotoxin (CHO- und SPF-Test), das jedoch nur ein Tausendstel der biologischen Aktivität des Choleratoxins besaß (Takeda et al., 1977; Keusch et al., 1972; Keusch und Donata, 1975 und McIver et al., 1975).

Die hitzelabilen Enterotoxine von *Klebsiella pneumoniae*- und vor allem von *Enterobacter cloacae*-Stämmen waren vorwiegend bzw. ausschließlich im RPT nachweisbar, was trotz vieler Gemeinsamkeiten mit dem Choleratoxin und *E.coli*-LT auf einen erheblichen Unterschied zwischen den verschiedenen Enterotoxinen schließen läßt (Klipstein et al., 1979).

Die Produktion von hitzelabilen und hitzestabilen Enterotoxinen untersteht bei *E.coli*- und anderen Enterobakterien-Stämmen der Kontrolle eines Übertragbaren Plasmids (Gyles et al. 1974). Die Bedeutung dieser von Skerman et al. (1972) erstmals demonstrierten Übertragbarkeit ist noch nicht abgeklärt. Bettelheim et al. (1980) betrachteten in der Umwelt vorkommende, Ent-Plasmid - tragende *E. coli*-Stämme als potentielle Infektionsquelle für andere gram-negative Keime, die gewöhnlich nicht enteropathogen sind. Bei den coliformen Keimen war eine besonders große Instabilität des Ent-Plasmids festzustellen, was vermuten läßt, daß die meisten Ent-Plasmide durch ETEC-Stämme übertragen werden (Wadström, 1978; Bäck et al., 1980; Guerrant et al., 1976).

Die Wirkungsweise von Choleratoxin und *E.coli*-LT beruht grundsätzlich auf der Anregung der Adenylzyklase und der

dadurch ausgelösten Reaktionskette, die in Tabelle 3 dargestellt ist. In der Regel (eine Ausnahme bilden hier die Nahrungsmittelvergifter) besiedeln die Erreger zunächst den Dünndarm, heften sich mit Hilfe spezifischer Virulenzfaktoren (CFAs) an das Mukosaepithel und beginnen mit der Toxinproduktion. Cholera toxin wie E.coli-LT bestehen aus der biologisch aktiven, nur schwach antigenen A-Kette und der für die Bindung an die Wirtszelle zuständigen, immunologisch bedeutsamen B-Kette. Die B-Kette bindet sich zuerst an das Monogangliosid GM₁, den für die Bindung spezifischen Rezeptor der Dünndarmepithelzelle (Craig et al., 1976). Danach wird die A-Kette in 2 Peptide, A₁ (=α) und A₂ (=γ), gespalten. Das biologisch aktivere A₁ (=α)-Peptid katalysiert nun den Transfer der Adenosin-Diphosphat-Ribose von Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) auf ein Guanosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein. Die Funktion des A₂ (=γ)-Peptids ist bisher unbekannt. Der nächste Schritt besteht in der durch die Adenylzyklase bewirkten Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches 3',5' Adenosin-Monophosphat (cAMP). Das cAMP löst nun seinerseits über einen bislang unbekannten Mechanismus eine aktive Sekretion von Cl⁻- und HCO₃⁻-Ionen in das Darmlumen aus, wobei die Resorption von Na⁺-Ionen vermindert ist. Zur Diarrhoe führender Elektrolyt- und Wasserverlust sind die Folge. Die Aktivierung der Adenylzyklase ist aber nicht allein auf die Mucosazellen des Dünndarms beschränkt, was letztlich die Entwicklung der Zellkulturtests zum Enterotoxinnachweis erst ermöglichte. Durch hitzelabiles Enterotoxin erhöhte cAMP-Konzentrationen werden neben den Mausadrenal-, Hamsteroarial- und Verozellen auch bei Schilddrüsenzellen (Mashiter et al., 1973), Fettzellen (Vaughan et al., 1970), Leukozyten (Bourne et al., 1973), Thymuszellen (Zenser und Metzger, 1974), Tauben-Erythrozyten (Gill et al., 1976), Fibroblasten aus der menschlichen Lunge und Neuroblastenzellen von der Maus (Thelestam, 1978) beobachtet.

2.3.2. Hitze stabiles Enterotoxin

Weitaus weniger weiß man über Aufbau und Wirkungsweise

des hitzestabilen Enterotoxins (ST) von E.coli und anderen gramnegativen Bakterien. Dieses Toxin ist ein sehr kleines, thermo- und säurestabiles, dialysierbares, nicht antigen wirksames Polypeptid, und ist gegenüber Pronase, Trypsin, Desoxyribonuklease (DNA-ase) und Ribonuklease (RNA-ase), Phospholipase C, Azeton, Phenol, Chloroform und Methanol resistent (Alderete und Robertson, 1978). Viele Autoren befaßten sich mit dessen Reinigung und Charakterisierung und stellten über Dialyse, Ultrafiltration und Gelfiltrationschromatographie MG-Werte zwischen 1 000 und 10 000 fest (Bywater, 1972; Jacks und Wu, 1974; Metz und Ohgke, 1976). Auch bei *Klebsiella pneumoniae*-, *Yersinia enterocolitica*- und *Enterobacter cloacae*-Stämmen bewegte sich das St-MG zwischen 1 000 und 10 000 (Klipstein und Engert, 1975 und 1976 b; Okamoto et al., 1981; Rao et al., 1979 und Robins-Brown et al., 1979).

Von bestimmten ETEC-Stämmen können mindestens 2 verschiedene ST-Formen gebildet werden. Schon Moon und Whipp (1970) teilten die ETEC-Stämme des Ferkels, je nach ihrer Wirkung auf unterschiedliche Altersgruppen, in Klassen ein. Stämme der Klasse 1 produzieren ein ST, das bei Ferkeln aller Altersklassen und Stämme der Klasse 2 produzieren ein ST, das nur in Ferkeln, die jünger als 2 Wochen sind eine positive Reaktion hervorruft. STa (von ETEC-Stämmen der Klasse 1) ist in Methanol löslich, teilweise hitzestabil und reagiert positiv im BMT und Ferkel-DLT. Das STb (von ETEC-Stämmen der Klasse 2) ist dagegen in Methanol unlöslich, hitzestabil, negativ im BMT, und nur in Saugferkeln (1-3 Tage alt) positiv (Burgess et al., 1970).

Bei humanen ETEC-Stämmen entdeckten Nalin et al., (1978) ein im Darm vom Hund wirksames ST, das in Babymäusen nicht nachweisbar war. Madsen und Knoop (1980) konnten durch Isoelectric Focusing von UM-2 Filtraten beim ST (MG ca 2 500) von humanen ETEC-Stämmen 2 enterotoxisch aktive Fraktionen nachweisen.

Kapitany et al. (1979 a) fanden bemerkenswerte Unterschiede in der Hitzestabilität und Aminosäuresequenz bei ETEC-Stämmen von Rind und Schwein. Während jeweils das rohe ST von ETEC-Stämmen vom Rind und Schwein hitzestabil war, wurde die gereinigte ST-Form von bovinen ETEC-Stämmen fast völlig inaktiviert. Das ST von "porcinen" ETEC-Stämmen blieb dagegen auch in gereinigter Form hitzestabil. Kapitany et al. (1979) machten das auffallende Fehlen von Cystein im bovinen ST-Molekül für dessen mangelhafte Hitzestabilität verantwortlich. Ihrer Meinung nach kann das STa in einer hitzestabilen und einer hitzelabilen Form auftreten.

Die Wirkungsweise des thermostabilen Enterotoxins ist im Vergleich zum hitzelabilen Enterotoxin wenig erforscht. Weder die für die Adhäsion des ST's zuständigen Rezeptoren der Wirtszelle noch der zur Diarrhoe führende biochemische Reaktionsablauf sind vollständig bekannt. Man weiß bisher nur, daß das ST die Aktivität der Guanylylzyklase des Dünndarmepithels steigert und die erhöhten Konzentrationen an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) als intrazelluläre Mediatoren für die Flüssigkeitssekretion verantwortlich sind (Field et al., 1978; Hughes et al., 1978; Newsome et al., 1978). Bereits 3 Minuten nach ST-Verabreichung stellt sich ein 10-facher Anstieg des cGMP-Spiegels in der Darmmucosa ein, der über 120 Minuten erhöht bleibt. Der cAMP-Spiegel sinkt dagegen innerhalb von 3 Minuten um 50 % gegenüber den Werten der Kontrolltiere, und bleibt für die Dauer der ST-Wirkung unter seinem Normalniveau (Giannella und Drake, 1979). ST stimuliert ausschließlich die membrangebundene Guanylylzyklase von Dünndarmepithelzellen. Adrenerge oder cholinerge Mechanismen spielen keine Rolle bei der ST-Wirkung. Dagegen scheinen freie Radikale oder oxidative Zwischenprodukte, evt. Prostaglandine oder endoperoxische Verbindungen, bei der Aktivierung der Guanylylzyklase sehr wohl beteiligt zu sein. Bisher konnte jedoch weder die Art dieser reaktiven Substanzen noch ihre genaue Wirkungsweise identifiziert werden (Guerrant et al., 1980).

Tabelle 1: Überblick über enterotoxinbildende Enterobakterien

Bakterienart	Herkunft der Bakterienstämme	Art des Enterotoxins	Struktur des Enterotoxins	Nachweissystem
<i>Escherichia coli</i>	Kalb, Ferkel, Lamm Hund, Lebensmittel, Mensch	LT ST	MG ca 73 000, protein MG 1000-10 000 peptid	Zellkultur, PIH, ELISA, RIA, SPF-Test BMT, SPF-Test, RIA
<i>Citrobacter freundii</i>	Mensch	LT	NI	DLT, Zellkultur
<i>Salmonella</i> spp.	Kalb, Geflügel, Lebens- u. Futter- mittel, Mensch	LT ST	MG 84 000-90 000 MG 84 000-90 000	Zellkultur, SPF-Test, DLT BMT, SPF-Test
<i>Shigella dysenteriae</i>	Mensch	LT	NI	DLT, SPF-Test, Zellkultur
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mensch	LT ST	NI MG ca 5000	Zellkultur, RPT RPT, DLT
<i>Enterobacter cloacae</i>	Mensch	LT ST	NI MG 1000-10 000	RPT, Zellkultur RPT, BMT
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Mensch	LT	NI	Zellkultur
<i>Hafnia alvei</i>	Mensch	LT	NI	Zellkultur

Fortsetzung von Tabelle 1: Überblick über enterotoxinbildende Enterobakterien

Bakterienart	Herkunft der Bakterienstämme	Art des Enterotoxins	Struktur des Enterotoxins	Nachweisssystem
<i>Serratia marcescens</i>	Mensch	LT	NI	Zellkultur
<i>Proteus morgani</i>	Mensch	LT ST	NI NI	Zellkultur BMT
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Schwein, Rind, kl. Nager, Vogel, Fisch, Lebensmittel, Wasser, Erde, Mensch	ST	MG ca 9000	BMT, DLT
<i>Vibrio cholerae</i>	Mensch	LT	MG ca 84 000 Protein	Zellkultur, SPF-Test, ELISA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Mensch	LT	NI	Zellkultur
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Fisch, Wasser, Mensch	LT ST	NI NI	DLT, Zellkultur, SPF-Test BMT
<i>Aeromonas sobria</i>	Fisch, Wasser, Mensch	LT ST	NI NI	DLT BMT

LT = hitzestabiles Enterotoxin, ST = hitzestabiles Enterotoxin, DLT = Darmligaturtest,

BMT = Babymaustest, RPT = Rattenjejunum-Perfusionstest, SPF-Test = Hautpermeabilitätstest,

PIH = Passive Immunhämolysse, ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay, RIA = Radioimmunoassay,

MG = Molekulargewicht, NI = nicht identifiziert

Tabelle 2: Überblick über die Nachweissysteme für Enterotoxine

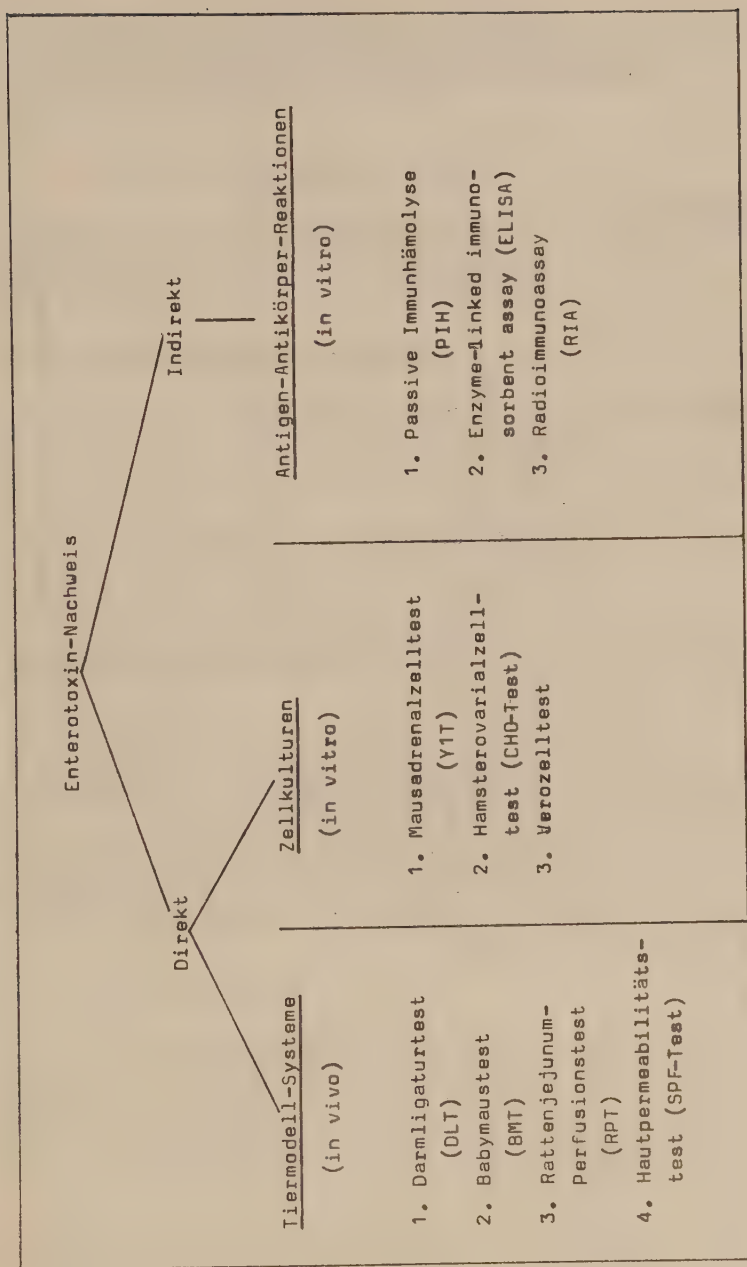
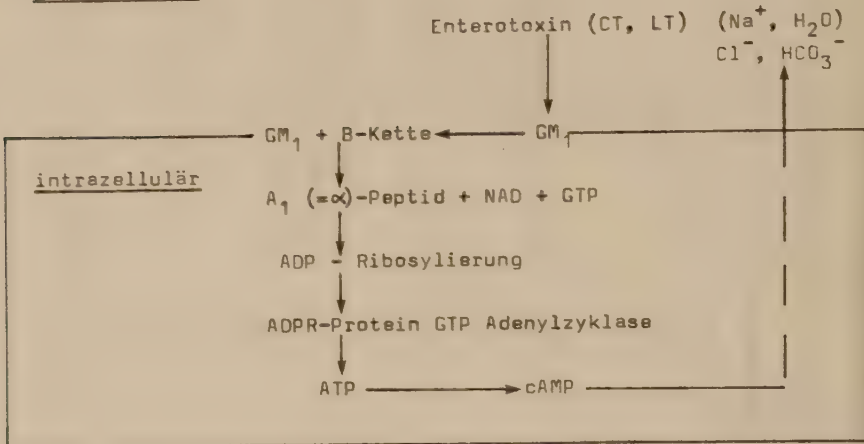


Tabelle 3: Wirkungsweise des hitzelabilen Enterotoxins von *Vibrio cholerae* und *E.coli* (nach Bockemühl, 1980)

extrazellulär



CT = Choleratoxin, LT = hitzelabiles Enterotoxin, GM₁ = Monogangliosid GM₁ (spezifischer Rezeptor), A₁ (=α)-Peptid = biologisch aktiver Teil des Enterotoxinmoleküls, NAD = Nikotinamid-adenin-dinukleotid, GTP = Guanosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, ADPR = Adenosindiphosphat-Ribose, ATP = Adenosintriphosphat, c AMP = zyklisches 3',5' Adenosin-Monophosphat

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Herkunft der Salmonella-Stämme

Insgesamt wurden 90 Salmonella-Stämme in die Untersuchungen einbezogen. Diese Isolate stammten von Schlachtrindern und Schlachtkälbern aus dem Raum Oberbayern.

3.1.2. Anzüchtung und Isolierung

Die Fleisch- und Organproben der beanstandeten Tiere wurden an der Bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle des Schlachthofes München auf Keimart und Keimzahl untersucht. Die Anzucht der Keime erfolgte hierbei auf festen Nährböden (Agar-Platten (13 % ig), Fuchsin-Laktose-Agar nach ENDO (Merck Nr. 4044), Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Agar nach Kauffmann (Merck Nr. 72 36), Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agar nach Gassner (Merck Nr. 1282)) sowie zur Anreicherung in Tetrathionat-Kristallviolett-Anreicherungsbouillon nach Preuss (Merck Nr. 5173). Nach einer Bebrütungsdauer von 16-18 Stunden bei 37°C fand die Überprüfung (Objektträgerschnellagglutination) der Salmonella-verdächtigen Kulturen mit Salmonella-Sera (polyvalent I-III oder omnivalent) der Fa. Behringwerke AG statt. Die biochemische Bestimmung der positiven Kulturen umfaßte die Kleine Bunte Reihe und im Zweifelsfall zusätzlich das Enterotube-Verfahren der Fa. Roche.

3.1.3. Differenzierung

Die bei der Probeagglutination mit polyvalenten Salmonella-Sera positiv reagierenden Bakterienkolonien wurden mit Hilfe von monovalenten Faktorensen (Anti-O und Anti-H) der Fa. Behringwerke AG nach dem Schema von Kauffmann und

White identifiziert¹⁾. Nach Überimpfung dieser Salmonella-Stämme auf Schrägagar und 18-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Röhrchen mit in heißes Paraffin getauchten Korken verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C gehalten. Für die jeweiligen Untersuchungen wurden die Keime in Standard I-Bouillon frisch angezüchtet.

3.1.4. Verfahren der Überprüfung des Verhaltens gegenüber Antibiotika

Die Prüfung auf Sensibilität gegenüber 12 antibakteriellen Substanzen (vgl. Tab. 4) erfolgte qualitativ im Plattendiffusionsverfahren. 18 Stunden alte Standard I-Bouillon-Kulturen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 1:1 000 verdünnt und davon 0,1 ml auf Müller-Hinton Agar ausgespatelt. Um die in den aufgelegten Testblättchen der Fa. Röhm Pharma GmbH bzw. Antibiotika-Testringen der Fa. Mack enthaltenen Antibiotika genügend in den Agar diffundieren zu lassen, wurden die Platten vor der 18-stündigen Bebrütung bei 37°C eine Stunde lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Unterscheidung zwischen resistenten und empfindlichen Stämmen erfolgte unter Berücksichtigung der Hemmhofgröße. Als Bewertungsmaßstab dienten die Angaben der Fa. Bio-Merieux (1978), die Angaben des Deutschen Institutes für Normierung e.V. (DIN 58940, Teil 3, 1976) und das National Committee for Clinical Laboratory Standards (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Arbeitsgemeinschaft "Resistenz", 1978).

¹⁾Für die Bestätigung unserer Ergebnisse bei der Salmonella-Differenzierung danken wir dem Landesuntersuchungsamt in Oberschleißheim sowie dem Bundesgesundheitsamt, der Zentralstelle für vet.-med. Salmonellaforschung im Institut für Veterinärmedizin (Robert von Ostertag-Institut) in Berlin.

3.1.5. Nachweis der Enterotoxizität bzw. Enterotoxinbildung

3.1.5.1. Darmligaturtest

Die Durchführung erfolgte nach der von Baljer et al. (1975) beschriebenen Technik. Dabei wurden 3-5 Wochen alte unter konventionellen Bedingungen gehaltene Ferkel verwendet. Jeder Salmonella-Stamm wurde bei 2 verschiedenen Ferkeln ausgetestet. Die Länge der Darmsegmente betrug 10 cm. Zwischen den belasteten Segmenten lagen 5 cm lange mit physiologischer Kochsalzlösung beimpfte Kontrollsegmente. Um den Empfindlichkeitsverlust zwischen Anfang und Ende des Dünndarmes mitberücksichtigen zu können wurde jeweils am Anfang und Ende der Versuchsreihe derselbe S.typhimurium-Stamm (L₁-Bouillon) als Positiv-Kontrolle ausgetestet. Als Inokulum diente 1 ml einer 18-stündigen Bouillon-Kultur. 18 Stunden post operationem wurden die Tiere getötet und die Reaktion auf Grund der gebildeten Flüssigkeitsmenge beurteilt. Die Bewertung der Reaktionen erfolgte in Anlehnung an das von Baljer et al. (1975) beschriebene Bewertungsschema von negativ bis 4+.

3.1.5.2. Babymaustest

Der Test wurde nach der von Alderate und Robertson (1977) beschriebenen Technik durchgeführt. Hierbei wurde 0,1 ml mit Farblösung (Trypanblau-Lösung) versetztes Kulturfiltrat oral über eine Sonde in den Magen von 3-4 Tage alten Babymäusen appliziert. Die Austestung jedes einzelnen Salmonella-Stammes erfolgte bei mindestens 2 Tieren. Die Mäuse wurden anschließend bei 22°C Umgebungstemperatur gehalten und nach 4 Stunden getötet. Ein Verhältnis von Darmgewicht zu übrigem Körpergewicht das größer als 0,080 war wurde als positive Reaktion gewertet.

3.1.5.3. Varozelltest

Die Durchführung des Tests erfolgte nach der von Speirs et al. (1977) beschriebenen Technik. Die Zellen wurden in Earl Minimal essential Medium + 5 % fetales Kälberserum + 1,5 % NaHCO_3 + Antibiotika (Penicillin/Streptomycin/Polymyxin; insgesamt 0,1 mg/100 ml) angezüchtet. Nachdem der Zellrasen dicht war, wurde das Anzuchtmedium abgegossen und der Zellrasen mit 1,8 ml Erhaltungsmedium (Earl Minimal essential Medium + 2 % fetales Kälberserum + 1,5 % NaHCO_3 + Antibiotikamischung (Penicillin/Streptomycin/Polymyxin + 40 µg Gentamycin/ml)) und 0,2 ml Überstand von 24 Stunden lang bei 37°C in Brain-Heart-Bouillon auf einem Schüttelapparat bebrüteten und anschließend zentrifugierten (45 min/3 000 U) Salmonella-Bouillonkulturen überschichtet. Nach einer 72-stündigen Bebrütungsdauer bei 37°C erfolgte die mikroskopische Ablesung der Zellreaktionen.

3.1.6. Hämagglutination

Der Nachweis von Pili und Fimbrien wurde in Anlehnung an die von Duguid et al. (1966) beschriebene Hämagglutination durchgeführt. Hierzu wurden die Salmonella-Stämme zweimal 48 Stunden lang in Standard I-Bouillon bei 37°C bebrütet. Die Durchführung des Hämagglutinationstestes erfolgte mit roten Blutkörperchen von Meerschweinchen. 2 Tropfen einer 2 %-igen (in physiologischer Kochsalzlösung jeweils mit und ohne Zusatz von 1 % Mannose) Suspension von gewaschenen Erythrozyten wurden in der Mulde einer Glasplatte zu einem Tropfen eines durch Zentrifugieren der Kulturbouillon gewonnenen Keimkonzentrates gegeben, und auf einem Shaker bei 36 rpm/min. insgesamt 30 min. lang vermischt. Die Untersuchung auf Hämagglutination wurde mit bloßem Auge bereits eine Minute nach Schüttel-Beginn und danach in 5-minütigen Abständen durchgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über die beim Resistenztest ver-
wendeten antibakteriellen Substanzen

Antibiotika- Testblättchen	Beschickung (Dosis in µg)	Als positiv (=sensibel) bewertete Hemmzonen- durchmesser (in mm) ¹⁾
Ampicillin (A)	10	≥ 17
Cephalothin (CF)	30	≥ 16
Chloramphenicol (C)	30	≥ 18
Tetracyclin (T)	30	≥ 23
Gentamycin (G)	10	≥ 18
Erythromycin (E)	15	≥ 15
Oxacillin (O)	5	≥ 15
Penicillin (P)	6 (=10E)	≥ 14
Carbenicillin (CA)	100	≥ 23
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol (TS)	25	≥ 13
Polymyxin B (PB)	30 (=300E)	≥ 14
Nitrofurazon (F)	100	≥ 16

1) nach den Angaben von

DIN: Deutsches Institut für Normung e.V.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards,
Bewertungsgrenzen, angegeben bei Paul-Ehrlich-
Gesellschaft für Chemotherapie e.V.,
Arbeitsgemeinschaft "Resistenz"

Bio-Merieux: Bewertungsgrenzen aufgrund der Laborerfahrungen
der Firma

3.2. Ergebnisse

Die von Schlachtrindern und Schlachtkälbern isolierten 90 Salmonella-Stämme wurden zunächst biochemisch identifiziert und serologisch typisiert. Nach dem Kauffmann-White-Schema ergab sich dabei folgende Artenverteilung (vgl. Tabelle 5). Der größte Teil der isolierten Salmonella-Stämme gehörte der Art *S.typhimurium* an, und zwar insgesamt 35 der isolierten 90 Stämme. An zweiter Stelle rangierte *S.dublin* mit 25 Stämmen. Auf *S.derby* und *S.thompson* entfielen schon deutlich weniger Stämme, nämlich 12 Stämme auf *S.derby* und 8 Stämme auf *S.thompson*. Alle anderen Salmonella-Arten spielten nur eine untergeordnete Rolle. Es wurden noch 3 *S.heidelberg*-, 2 *S.enteritidis*-, 2 *S.infantis*-, 2 *S.saint-paul*-Stämme und 1 Stamm von *S.münchen* isoliert. Der Anteil der vom Kalb isolierten Salmonella-Stämme betrug etwa 1/3 bzw. 1/4 der insgesamt isolierten Stämme.

Bei den identifizierten Stämmen wurden dann die biologischen Eigenschaften untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei die Fragen nach der Enterotoxinbildung, dem Vorhandensein von Pili und Fimbrien und der Resistenz.

Der Nachweis der Enterotoxinbildung bzw. der Enterotoxizität wurde zuerst mit dem Darmligaturtest durchgeführt. Das Ergebnis des Darmligaturtestes bei den 90 Salmonellastämmen ist in Tabelle 6 zusammengefaßt. Die Ergebnisse wurden je nach Stärke der Reaktion, d.h. je nach Menge der in den Segmenten gebildeten Flüssigkeit, von negativ bis 4+ bewertet.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich wird, waren von den 90 geprüften Salmonellastämmen 79 im Darmligaturtest positiv (1+ bis 4+) und nur 11 Stämme negativ. Die meisten positiven Stämme entfielen dabei auf *S.typhimurium*. Außerdem reagierten die *S.typhimurium*-Stämme auch am stärksten. 20 von 35 *S.typhimurium*-Stämmen zeigten eine 3+- oder 4+-Reaktion, dagegen taten dies nur 3 der 25 *S.dublin*-Stämme

und 11 der 30 "sonstigen" Salmonella-Stämme. Auf die S.dublin-Stämme entfiel der größte Anteil an negativen Stämmen (8 Stämme). Die "sonstigen" Salmonella-Stämme lagen bezüglich ihres Reaktionsspektrums zwischen den S.typhimurium- und S.dublin-Stämmen.

Als weiterer in vivo-Test zum Enterotoxinnachweis wurde der Babymaustest herangezogen. Im Gegensatz zum Darmligaturtest waren im Babymaustest jedoch alle 90 Stämme negativ (vgl. Tabelle 7).

Neben den beiden in vivo-Methoden prüften wir auch im Zellkulturtest in vitro die Enterotoxinbildung bei den isolierten Salmonella-Stämmen. Im Unterschied zum Darmligaturtest und Babymaustest prüften wir bei diesem Test nur die Kulturüberstände auf Enterotoxingehalt. Die Ergebnisse des Zellkulturtestes sind in Tabelle 7 aufgeführt. Alle 90 Stämme waren im Zellkulturtest positiv. 72 Stunden nach der Überschichtung der Zellkulturen mit den Überständen der 18-stündigen Salmonellakulturen kam es zu einem zytopathogenen Effekt, der sich in typischen Abkugelungen der Zellen äußerte.

Außer dem Ergebnis des Zellkulturtestes und des Babymaustestes sind in der Tabelle 7 zusätzlich noch die Ergebnisse der Hämagglutination mitaufgeführt. Die Hämagglutination wurde zum Nachweis von Fimbrien oder Pili durchgeführt. Die Reaktion wurde einmal mit Mannose (1 %) und einmal ohne Mannose angesetzt.

Bei keinem der Stämme konnte eine mannoseresistente Hämagglutination beobachtet werden. Der Zusatz der Mannose zum Reaktionsgemisch hemmte die Hämagglutination. Ohne Mannosezusatz zum Reaktionsgemisch war dagegen eine große Anzahl der Stämme positiv. Mannosesensitive, hämagglutinierende Eigenschaften besaßen insgesamt 82 der 90 untersuchten Salmonella-Stämme. Die meisten negativen Stämme entfielen auf die S.dublin-Stämme und zwar reagierten 7 der 25 untersuchten S.dublin-Stämme negativ. Von den

35 *S.typhimurium*-Stämmen waren 34 und von den 30 "sonstigen" *Salmonella*-Stämmen alle positiv in der Hämagglutination.

Eine besondere Stellung unter den biologischen Eigenschaften nehmen die Resistenzbildungen ein. In Abbildung 1 wurde das Ergebnis der Resistenzprüfung bei den 90 isolierten Stämmen graphisch dargestellt.

Aufgrund des Resistenzspektrums der 90 Stämme lassen sich die Antibiotika in 3 große Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe gehören Antibiotika gegen die die Mehrzahl der isolierten Stämme resistent ist. Dazu gehören Tetrazyklin (100 %), Erythromyzin (100 %) und Oxacillin (100 %) sowie das Penicillin (82,2 %). Eine zweite Gruppe umfaßt Antibiotika, gegen die nur ein begrenzter Prozentsatz der Stämme resistent ist. Dazu gehören Chloramphenicol (22,2 %), Trimethoprim (10 %) und Ampicillin (36,6 %) sowie mit Einschränkung auch das Carbenicillin (2,2 %). Zur dritten Gruppe gehören Antibiotika, gegen die mit einer Ausnahme alle Stämme empfindlich waren. Es sind dies Cephalothin (ein resistenter Stamm), Gentamycin, Polymyxin und Nitrofurazon.

Um Unterschiede im Resistenzspektrum der verschiedenen *Salmonella*arten aufzudecken wurden in Abbildung 2 die Ergebnisse der Resistenzprüfungen bei *S.typhimurium*-, *S.dublin*- und bei den "sonstigen" *Salmonella*-Stämmen getrennt aufgeschlüsselt. Dabei fällt auf, daß ein relativ großer Teil (60 %) der *S.dublin*-Stämme empfindlich gegenüber Penicillin ist, während die *S.typhimurium*-Stämme vollkommen und die "sonstigen" *Salmonella*-Stämme mit einer Ausnahme resistent gegen Penicillin sind. Ein weiterer Unterschied ist, daß 8 *S.typhimurium*-Stämme resistent gegen Trimethoprim sind, aber nur ein Stamm von *S.dublin*.

Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der Antibiotikaresistenz betrifft auch die Verbreitung der Mehrfachresistenzen unter den *Salmonella*-Stämmen. In Abbildung 3

sind die Mehrfachresistenzen der isolierten Salmonella-Stämme zusammengestellt und zwar wieder aufgegliedert in S.typhimurium-, S.dublin- und "sonstige" Salmonella-Stämme.

Bei der Gegenüberstellung der nachgewiesenen Mehrfachresistenzen fällt die relativ hohe Zahl an Stämmen auf, die gegen 4 Antibiotika gleichzeitig resistent sind. Dies ist auf die meistens zusammen auftretende Unempfindlichkeit gegenüber Makroliden und den ihnen verwandten Substanzen zurückzuführen. Die "sonstigen" Salmonella-Stämme waren mit einer Ausnahme alle nur 4-fach resistent. Bei S.dublin kommt es zu einem Schwerpunkt bei der 3-fach und 4-fach Resistenz (17 von 25 Stämmen ; 68 %). Daneben fanden wir aber auch Stämme mit 2- (12 %), 6- (12 %) und 7-facher (8 %) Resistenz. Die S.typhimurium-Stämme sind alle mehr als 3-fach resistent, wobei ein relativ hoher Prozentsatz (45,7 %) mehr als 4-fach resistent ist.

Tabelle 5: Verteilung der verschiedenen Salmonellaarten bei Schlachtrindern und Schlachtkälbern in Süddeutschland im Sommer und Herbst 1980 (Schlachthof München)

Salmonellaart	Anzahl der isolierten Stämme		
	gesamt	Rind	Kalb
S.typhimurium	35	24	11
S.dublin	25	20	5
S.derby	12	9	3
S.thompson	8	8	0
S.heidelberg	3	2	1
S.enteritidis	2	2	0
S.infantis	2	2	0
S.saint-paul	2	2	0
S.münchen	1	1	0

Tabelle 6: Ergebnis des Darmligaturtestes bei 90 vom Rind
isolierten Salmonella-Stämmen

Salmonella- Art	Anzahl der getesteten Stämmen	Ergebnis des Darmligaturtestes (Zahl der Stämme bei den ver- schiedenen Reaktionsstärken)				
		negativ	1+	2+	3+	4+
S.typhimurium	35	1	5	9	14	6
S.dublin	25	8	10	4	1	2
"sonstige" S.-Stämme	30	2	7	10	8	3
gesamt	90	11	22	23	23	11

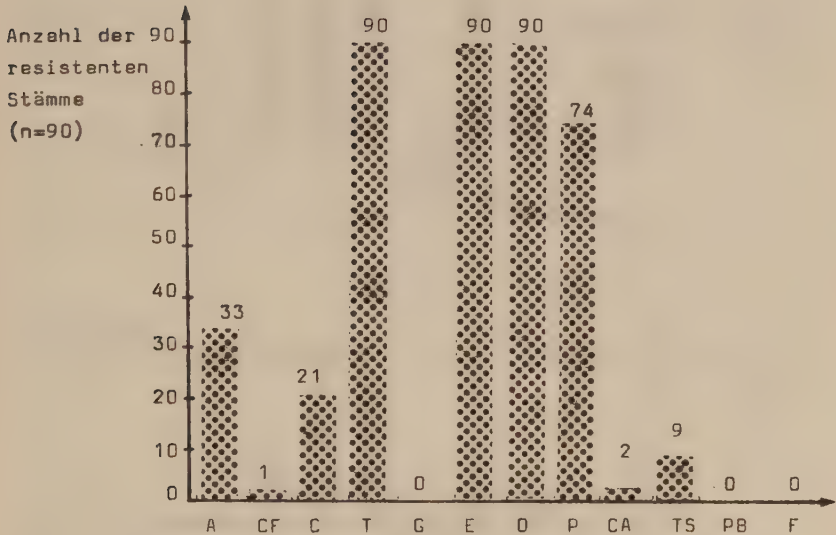
Tabelle 7: Ergebnis der Hämagglutination ¹⁾ und des Zellkultur-
testes²⁾ bei 90 vom Rind isolierten Salmonella-Stämmen

Salmonella- Art	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der positiven Stämme			
		Hämagglutination		Zell- kulturtest (Vero-Zellen)	Babymaus- test
		mit Mannose	ohne Mannose		
S.typhimurium	35	0	34	35	0
S.dublin	25	0	18	25	0
"sonstige" S.-Stämme	30	0	30	30	0
gesamt	90	0	82	90	0

1) Nachweis von pili und Fimbrien

2) Nachweis der Enterotoxinbildung

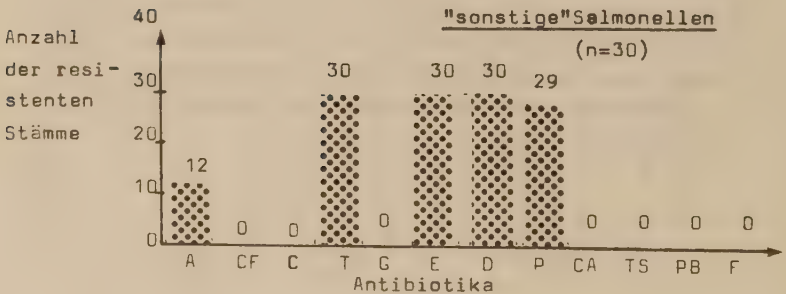
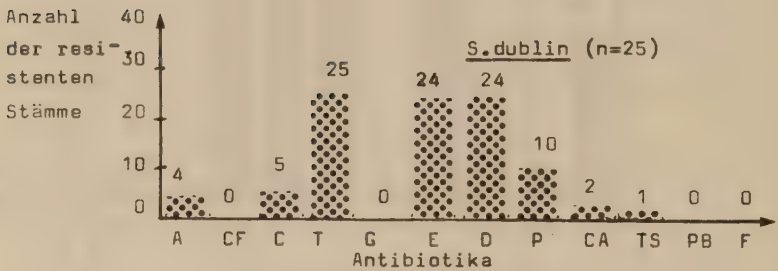
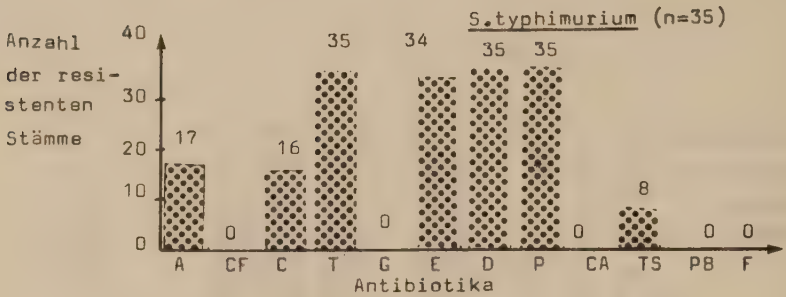
Abb. 1: Resistenzmuster bei 90 Salmonella-Stämmen vom Rind



Zeichenerklärung:

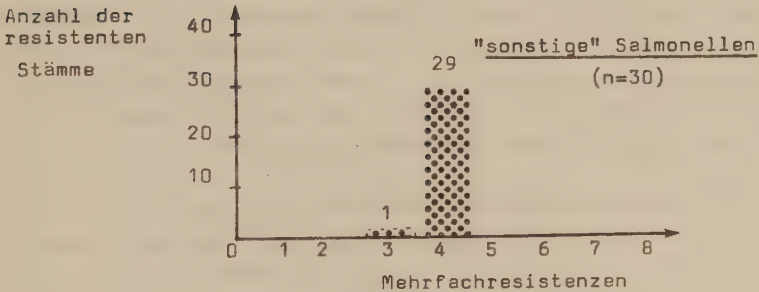
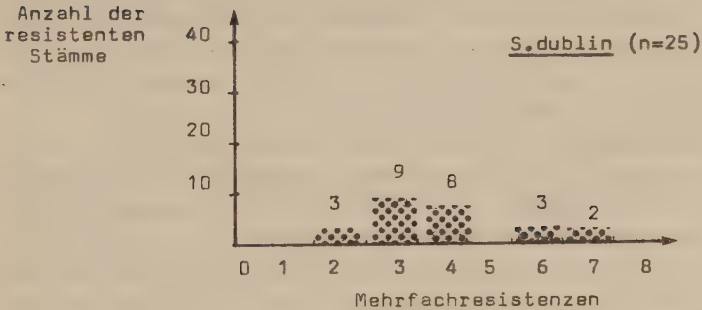
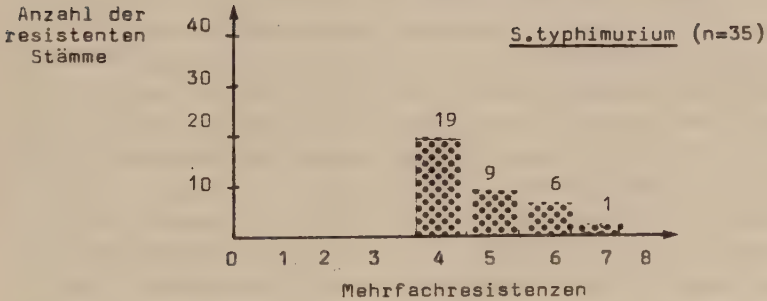
A: Ampicillin; CF: Cephalothin; C: Chlörampfenicol;
T: Tetracyklin; G: Gentamycin; E: Erythromycin;
O: Oxacillin; P: Penicillin G; CA: Carbenicillin;
TS: Trimethoprim/Sulfamethoxazol; PB: Polymyxin B;
F: Nitrofurazon

Abb. 2: Resistenzmuster¹⁾ bei verschiedenen Salmonella-Stämmen vom Rind.



¹⁾ getestete Antibiotika (siehe Legende von Tabelle 4)

Abb. 3: Überblick über die Mehrfachresistenzen¹⁾ bei den vom Rind isolierten Salmonella-Stämmen



¹⁾ getestete Antibiotika (siehe Legende von Tabelle 4)

4. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen konzentrierten sich im wesentlichen auf den Nachweis der biologischen Eigenschaften bei den isolierten Salmonella-Stämmen. Daneben wurden die isolierten Stämme aber auch serologisch differenziert. Obwohl die Zahl der untersuchten Stämme für eine allgemein gültige Aussage über die derzeitige Artenverteilung in Süddeutschland relativ klein und der Zeitraum der Isolierung auf ein halbes Jahr begrenzt war, entsprach die Artenverteilung bei den 90 Salmonellen-Stämmen der bei anderen Untersuchungen. Salmonella typhimurium und Salmonella dublin hatten mit einem Prozentsatz von 38,8 % bzw. 27,7 % den größten Anteil. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Untersuchungen beim Rind in Deutschland überein. Bei einer Gesamtzahl von 13 093 untersuchten Salmonella-Stämmen aus der gesamten BRD hatte S.typhimurium 1979 einen prozentualen Anteil von 38,2 % und S.dublin von 18,8 % (Pietzsch, 1981). Auch international gesehen spielen beim Rind S.typhimurium und S.dublin die größte Rolle, wobei je nach Gebiet entweder S.typhimurium oder S.dublin den größeren Anteil innehat. In den USA (43,3 %), Frankreich (60 %) oder Niederlande (63 %) dominiert z.B. S.typhimurium (Glickman et al., 1981; Smith et al., 1979; Cabion und Gledel, 1980; Guinée und Valkenburg, 1975) und in England und Wales (70 %) oder Schweden (54 %) S.dublin (Sojka et al., 1975; Sandsted et al., 1980). Bei den anderen von uns isolierten Salmonella-Stämmen fällt auf, daß S.derby (13,3 %) und S.thompson (8,9 %) relativ häufig isoliert wurde, was bisher in dem Maße noch nicht der Fall war (Pietzsch, 1978 und 1981; Müller, 1978).

Von den biologischen Eigenschaften mit pathogenetischer Bedeutung steht der Nachweis der Enterotoxizität an erster Stelle. Wir haben die isolierten Stämme in 3 Nachweissystemen (Darmligatur-, Zellkultur- und Eatymaustest) auf ihre Enterotoxizität untersucht. Die Ergebnisse bei den verschiedenen Stämmen waren

aber einheitlich. Alle Stämme reagierten im Zellkulturtest, und 90 % der Stämme im Darmligaturtest positiv, während im Babymaustest alle Stämme negativ waren. Der Unterschied von 10 % im Ergebnis des Darmligaturtestes und des Zellkulturtestes ist sicher technisch bedingt. Der Darmligaturtest ist nicht so leicht standardisierbar als der in vitro-Nachweis in der Zellkultur. Die Sensibilität des Darmligaturtestes wurde in den Untersuchungen von Sedlock und Deibel (1977) durch Spülung der Darmsegmente mit mucolytischen Lösungen verbessert, eine Methode auf die wir in unseren Untersuchungen verzichtet haben. Außerdem sind Prüfungen an derselben Tierart empfindlicher. Wir haben jedoch aus versuchstechnischen Gründen das Ferkel (leichtere Handhabung, geringere Kosten usw.) dem Kalb vorgezogen. Nachdem aber der Zellkulturtest für den Nachweis des Salmonellaenterotoxins empfindlicher ist als der Darmligaturtest kann für zukünftige Versuche der Zellkulturtest als Alternativmethode zum Darmligaturtest empfohlen werden.

Unsere Untersuchungen bestätigen die Vermutung von Sandefur und Peterson (1976), Sedlock et al. (1978) und Jiwa (1981), daß die Eigenschaft der Enterotoxinbildung bei den Salmonellen ein konstantes Merkmal ist. Bei dem von uns nachgewiesenen Enterotoxin handelt es sich um ein hitzelabiles Enterotoxin, da alle Stämme in dem für hitzestabiles Enterotoxin spezifischen Babymaustest negativ blieben. In anderen Untersuchungen wurde bei Salmonella-Stämmen zwar sowohl hitzestabiles als auch hitzelabiles Enterotoxin nachgewiesen (Sedlock et al., 1978; Sandefur und Peterson, 1976), Stämme mit hitzestabilem Enterotoxin waren aber relativ selten unter den Salmonellen. Jiwa (1981) isolierte bei 67 Stämmen nur 4, die hitzestabiles und 44, die hitzelabiles Enterotoxin bildeten. Übereinstimmend lag in allen Untersuchungen der Prozentsatz der Enterotoxizität bei Salmonellen sehr hoch (Kühn et al., 1978; Jiwa, 1981).

Der mit der Hämagglutination geführte Nachweis auf Pili bzw. Fimbrien brachte ebenfalls ein nahezu einheitliches Ergebnis. Fast alle isolierten Salmonella-Stämme waren in der Hämagglutination positiv. Im Gegensatz zu den enterotoxischen Escherichia coli-Stämmen wurde aber die Reaktion durch Mannose gehemmt, d.h. die Fimbrien oder Pili der Salmonellen sind nicht mit den bei enterotoxischen Escherichia coli-Keimen als Anheftungsfaktoren bekannten Fimbrien oder Pili wie z.B. dem K 88- und K 99-Antigen oder dem CFA-Antigen identisch. In den wenigen vergleichbaren Untersuchungen konnte ebenfalls nur eine "Mannose-sensitive" Hämagglutination bei Salmonellen nachgewiesen werden (Evans et al., 1979; Duguid et al., 1966). Das gleiche Reaktionsbild, nämlich eine Mannose-sensitive Hämagglutination zeigen auch die enteropathogenen Escherichia coli-Keime. Sakazaki et al. (1974) vermuten deshalb, daß Salmonellen und enteropathogene Escherichia coli-Keime pathogenetisch verwandt sind. Bei beiden soll weniger die Anheftung an die Darmschleimhaut sondern mehr die Vermehrung im Darmlumen für das Angehen der Infektion entscheidend sein. Für Salmonellen und enteropathogene E.coli muß deshalb die Mindestinfektionsdosis wesentlich höher liegen als bei den zur Anheftung an die Darmwand befähigten enterotoxischen Escherichia coli-Keimen. Die Fimbrien oder Pili von Mannose-sensitiven Keimen sollen nach Polotsky et al. (1977) möglicherweise für die Penetration der Keime in die Darmschleimhaut verantwortlich sein.

Die Ergebnisse der Enterotoxin- und Hämagglutinationsteste lassen 2 Schlußfolgerungen zu. 1.) Die Salmonella-Stämme reagieren in bezug auf diese beiden Pathogenitätsnachweise einheitlich, so daß eine Differenzierung auf der Basis dieser biologischen Eigenschaften routinemäßig nicht notwendig ist und 2.) durch das fast 100 %-ige Vorhandensein der Pathogenitätsfaktoren ist es gerechtfertigt alle Salmonella-Stämme grundsätzlich als pathogen anzusprechen.

Im Gegensatz zu Befunden aus den USA (Ryder et al., 1980; Cherubin, 1981) stellten wir in der Bundesrepublik keine wesentliche Zu- oder Abnahme an resistenten Salmonella-Stämmen fest. Die von uns ermittelten Resistenzquoten für die einzelnen Antibiotika stimmen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, mit denen von Stephan et al. (1973, 1976, 1977) aus den Jahren 1971 bis 1975 überein.

Die Unterschiede zwischen unseren und den von Stephan et al. (1973, 1976, 1977) beschriebenen Ergebnissenschwanken bei den meisten Antibiotika im Bereich von 10 %, einem Prozentsatz dem bei der Zahl der untersuchten Stämme keine Bedeutung beigemessen werden kann. Deutliche Unterschiede waren nur beim Chloramphenicol zu verzeichnen. Nach Stephan et al. (1973, 1976, 1977) stieg die Zahl der Chloramphenicol-resistenten Stämme von 15,8 % auf 47 % in den Jahren 1971 bis 1975. In unseren Untersuchungen waren dagegen wieder nur 23,3 % der Salmonella-Stämme gegen Chloramphenicol resistent. Bemerkenswert ist noch das erstmalige Auftreten von Trimethoprim-resistenten Salmonella-Stämmen. In den früheren Untersuchungen konnten noch keine Resistenzbildungen gegen Trimethoprim nachgewiesen werden (Stephan et al., 1976; 1977).

Für eine antibiotische Behandlung bei Salmonellosen können derzeit Gentamycin, Polymyxin B und Nitrofurazon uneingeschränkt empfohlen werden. Gegen diese Chemotherapeutika stellten wir, wie auch Neu et al. (1975), Stephan et al. (1976, 1977) und Sojka und Wray (1977, 1980) keine resistenten Salmonella-Stämme fest.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 90, von Schlachtrindern isolierte *Salmonella*-Stämme aufgrund ihrer Artenzugehörigkeit, ihren enterotoxischen und hämagglutinierenden Eigenschaften und ihrem Verhalten gegenüber Antibiotika charakterisiert. Der Nachweis der biologischen Eigenschaften erfolgte mit dem Darmligatur-, Babymaus- und Zellkulturtest (Enterotoxin) sowie der Hämagglutination (Pili/Fimbrien) und dem Plattendiffusionsverfahren (Resistenz).

Von den 90 *Salmonella*-Stämmen entfielen 38,9 % auf *S.typhimurium* und 27,8 % auf *S.dublin*. 30 Stämme verteilten sich auf folgende Arten: *S.derby* (13,3 %), *S.thompson* (8,9 %), *S.heidelberg* (3,3 %), *S.enteritidis* (2,2 %), *S.infantis* (2,2 %), *S.saint-paul* (2,2 %) und *S.münchen* (1,1 %).

Der Nachweis der Enterotoxizität gelang im Darmligaturtest bei 87,8 % und im Zellkulturtest bei 100 % der Stämme. Da alle Stämme im Babymaustest negativ waren, handelt es sich bei dem nachgewiesenen Enterotoxin um die hitze-labile Variante.

In der Hämagglutination reagierten 91,1 % der Stämme positiv. Die nachgewiesenen Hämagglutinine (Pili/Fimbrien) gehörten dem Mannose-sensitiven Typ an.

Alle 90 *Salmonella*-Stämme waren gegen Tetrazyklin, Erythromycin und Oxacillin resistent. Gegen Penicillin wiesen 82,2 %, gegen Chloramphenicol 23,3 % und gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol 10 % der Stämme Resistenz auf. Bei Cephalothin (1,1 %) und Carbenicillin (2,2 %) traten nur bei einer geringen Zahl von Stämmen Resistenzen auf, und bei Gentamycin, Polymyxin B und Nitrofurazon wurden überhaupt keine resistenten Stämme festgestellt.

Summary

90 salmonella strains which were isolated from slaughter cattle were characterized according to their species, their enterotoxic and hemagglutinating properties, and to their behaviour in response to antibiotics. Their biological properties were proven by the ligated gut loop test, the infant mouse test, and the cell culture test (enterotoxin) as well as by the hemagglutination test (pili/fimbriae) and the agar diffusion test (resistance).

39.9 % of these 90 salmonella strains belonged to *S.typhimurium* and 27.8 % to *S.dublin*. 30 strains are attributed to the following species: *S.derby* (13.3 %), *S.thompson* (8.9 %), *S.heidelberg* (3.3 %), *S.enteritidis* (2.2 %), *S.infantis* (2.2 %), *S.saint-paul* (2.2 %), and *S.münchen* (1.1 %).

Enterotoxigenicity was proven in 87.8 % of all strains by the ligated gut loop test and in 100 % of all strains by the cell culture test. As all the strains reacted negatively to the infant mouse test, the proven enterotoxin belongs to the heat-resistant type.

91.1 % of the strains reacted positively to the hemagglutination test. The proven hemagglutinins (pili/fimbriae) belonged to the mannose-sensitive type.

All of the 90 salmonella strains proved to be resistant to tetracyclin, erythromycin, and oxacillin. Their resistance to penicillin was 82.2 % and to chloramphenicol 23.3 %. To trimethoprim/sulfamethoxazol 10 % of the strains proved to be resistant. Only a few strains demonstrated resistance to cephalothin (1.1 %) and carbenicillin (2.2 %); and none of the strains showed any resistance to gentamycin, polymyxin B, and nitrofurazone.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Acosta-Martinez, F., C. Gyles, and D.G. Butler: *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in feces and intestines of calves with diarrhea.
Am. J. of Vet. Res. 41, 1143-1149 (1980)
- Alderete, J.F., and D.C. Robertson: Nutrition and enterotoxinsynthesis by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*: defined medium for production of heat-stable enterotoxin.
Infect. Immun. 15, 781-788 (1977)
- Alderete, S.F., and D.C. Robertson: Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 19, 1021-1030 (1978)
- Baljer, G., S. Chorherr, E. Sickel und D. Giessen: Orale, aktive Immunisierung neugeborener Ferkel gegen *Escherichia coli*; Wirksamkeitsnachweis im Darmligaturtest
Zbl. Vet. Med. B 22, 488 (1975)
- Baljer, G. und J.T. Barrett: Nachweis von enterotoxinbildenden *Pseudomonas Aeruginosa*-Stämmen im Darmligaturtest beim Ferkel.
Zbl. Vet. Med. B, 26, 740-747 (1979)
- Bäck, E., R. Möllby, B. Kaijser, G. Stintzing, T. Wadström, and D. Habte: Enterotoxigenic *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen, and loss of enterotoxigenicity.
J. Infect. Dis. 142, 318-327 (1980)
- Bettelheim, K.A., M.W. Wilson, R.A. Shooter, and S.M. O'Farrell: Studies on the enterotoxigenicity of environmental *Escherichia coli* belonging to serotypes normally considered enterotoxigenic.
J. Hyg. 84, 411-414 (1980)

- Black, R.E., M.H. Merson, A.S.M.M. Rahman, M. Yunes, A.R.M.A. Alim, J. Hug, R.H. Yolken, and G.T. Curlin: A two-year study of bacterial, viral, and parasitic agents associated with diarrhea in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 142, 660-664 (1980)
- Bockemühl, J., G. Fricke, and H.P.R. Seeliger: Enteritis-fälle durch *Escherichia coli* O 142 K 86 H 34 in einer Frühgeborenenstation mit einem Diskussionsbeitrag zur Frage der pathogenetischen Bedeutung "enteropathogener Coli-Typen". *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 243, 197-206 (1979)
- Bockemühl, J.: Eigenschaften und Wirkung von Enterotoxinen gramnegativer Bakterien. *Immunität und Infektion* 8, 43-49 (1980)
- Boulanger, Y., R. Lallier, and G. Cousineau: Isolation of enterotoxic *Aeromonas* from fish. *Can. J. Microbiol.* 23, 1161-1164 (1977)
- Bourne, H.R., R.J. Lehrer, L.M. Lichtenstein, G. Weissmann, and R. Zurier: Effects of cholera enterotoxin on adenosine 3',5' monophosphate and neutrophil function: comparison with other compounds which stimulates leukocyte adenyl cyclase. *J. Clin. Invest.* 52, 698-708 (1973)
- Boyce, J.M., D.J. Evans, D.G. Evans, and H.L. DuPont: Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 25, 532-537 (1979)
- Burgess, M.N., R.J. Bywater, C.M. Cowley, N.A. Mullan, and P.M. Newsome: Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21, 526-531 (1978)
- Burke, V., J. Robinson, H.M. Atkinson, and M. Gracey: Biochemical characteristics of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 15, 48-52 (1982)
- Bywater, R.J.: Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 5, 337-343 (1972)

- Cabion, B., and J. Gladel: Salmonella and cattle diseases: study of strains isolated in France from 1976 to 1978. Rev. Med. Vet. 131, 63 (1980)
- Castro, A.F.P.De, M.B. Serafim, J.A. Gomes, and M.S.V. Gatti: Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol. 12, 714-717 (1980)
- Ceska, M., F. Großmüller, and F. Effenberger: Solid-phase radioimmunoassay method for determination of Escherichia coli enterotoxin. Infect. Immun. 19, 347-352 (1978)
- Cherubin, C.E.: Antibiotic resistance of Salmonella in Europe and the United States. Rev. Infect. Dis. 3, 1105-1126 (1981)
- Clements, J.D., and R.A. Finkelstein: Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun. 22, 709-713 (1978a)
- Clements, J.D., and R.A. Finkelstein: Immunological cross-reactivity between heat-labile enterotoxin(s) of Escherichia coli and subunits of Vibrio cholerae enterotoxin. Infect. Immun. 21, 1036-1039 (1978b)
- Craig, J.P.: A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalenscent cholera sera. Nature 207, 614-616 (1965)
- Craig, J.P., A.S. Banenson, M.C. Hardegree, N.F. Pierce, and S.H. Richardson: The structure and functions of enterotoxin. J. Infect. Dis. 133, (Suppl.), S1-S156 (1976)
- Cumberbatch, N., M.J. Gurwith, C. Langston, R.B. Sack, and J.L. Brunton: Cytotoxic enterotoxin produced by Aeromonas hydrophila: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. Infect. Immun. 23, 829-837 (1979)

De, S.N., and D.N. Chatterje: An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane.

J. Path. Bact. 66, 559-562 (1953)

De, S.N., K. Bhattacharya, and J.K. Sarkar: A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis.

J. Path. Bact. 71, 201-209 (1956)

Dean, A.G., Y. Ching, R.G. Williams, and L.G. Harden: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu.

J. Infect. Dis. 125, 407-411 (1972)

Donata, S.T., H.W. Moon, and S.C. Whipp: Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with use of adrenal cells in tissue culture.

Science 183, 334-336 (1974)

Dorner, F., H. Jaksche, and W. Stöckl: *Escherichia coli* enterotoxin: purification, partial characterization and immunological observations.

J. Infect. Dis. 133, (Supp.), S142-S156 (1976)

Duguid, J.P., E.S. Anderson, and J. Campbell: Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*.

J. Path. Bact. 92, 107-138 (1966)

Evans, D.G., D.J. Evans, and N.R. Pierce: Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*
Infect. Immun. 7, 873-880 (1973a)

Evans, D.G., D.J. Evans, Jr., and S.L. Gorbach: Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay.

Infect. Immun. 8, 731-735 (1973b)

Evans, D.J., Jr., D.G. Evans, and S.L. Gorbach: Polymyxin B-induced release of low molecular weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*.

Infect. Immun. 10, 1010-1017 (1974)

- Evans, D.J., Jr., and D.G. Evans: Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis.
Infect. Immun. 16, 604-609 (1977)
- Evans, D.J., D.G. Evans, H.L. DuPont, F. Orskov, and J. Orskov: Patterns of loss enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: suggestive evidence for an interrelationship with serotype.
Infect. Immun. 17, 105-111 (1977)
- Evans, D.J., Jr., D.G. Evans, and H.L. DuPont: Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and Guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose.
Infect. Immun. 23, 336-346 (1979)
- Field, M., L.H. Graf, Jr., W.J. Laird, and P.L. Smith: Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and iontransport in small intestine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2800-2804 (1978)
- Finkelstein, R.A., M.K. LaRue, D.W. Johnston, M.L. Vasil, G.L. Cho, and J.R. Jones: Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from enterotoxigenic *Escherichia coli*.
J. Infect. Dis. 133, (Suppl.), S120-S137 (1976)
- Frantz, J.C., and D.C. Robertson: Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of a radioimmunoassay specific for heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity.
Infect. Immun. 33, 193-198 (1981)
- Gianella, R.A., S.B. Formal, G.J. Dammin, and H. Collins: Pathogenesis of Salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reactions in rabbit ileum.
J. Clin. Invest. 52, 441-453 (1973)

- Giannella, R.A.: Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: characteristics of the model.
Infect. Immun. 14, 95-99 (1976)
- Giannella, R.A., and K.W. Drake: Effect of purified Escherichia coli heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion.
Infect. Immun. 24, 19-23 (1979)
- Giannella, R.A., K.W. Drake, and M. Luttrell: Development of a radioimmunoassay for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay.
Infect. Immun. 33, 186-192 (1981)
- Gill, D.M., D.J. Evans, Jr., and D.G. Evans: Mechanism of activation of adenylate cyclase in vitro by polymyxin-released, heat-labile enterotoxin of Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 133 (Suppl.), S103-S107 (1976)
- Gilligan, P.H., and D.C. Robertson: Nutritional requirements for synthesis of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic strains of Escherichia coli.
Infect. Immun. 23, 99-107 (1979)
- Glickman, L.T., P.L. McDonough, S.J. Shin, J.M. Fairbrother, R.L. LaDue, and S.E. King: Bovine Salmonellosis attributed to Salmonella anatum-contaminated haylage and dietary stress.
J. Am. Vet. Med. Ass. 178, 1268-1272 (1981)
- Gorbach, S.L., and C.M. Khurana: Toxigenic Escherichia coli: a cause of infantile diarrhea in Chicago.
N. Engl. J. Med. 287, 791-795 (1972)
- Greenberg, H.B., D.A. Sack, W. Rodriguez, R.B. Sack, R.G. Wyatt, A.R. Kalica, R.L. Horsewood, R.M. Chanock, and A.Z. Kapikian: Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin.
Infect. Immun. 17, 541-545 (1977)
- Gsell, D.: Die Entwicklung der Weltseuchenlage seit 1945 und die heutige epidemiologische Situation in Mitteleuropa
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 163, 1-33 (1976)

- Guerrant, R.L., L.L. Brunton, T.C. Schnaitman, L.J. Rebhuhn,
and A.G. Gilman: Cyclic adenosine monophosphate and
alteration of Chinese hamster ovary cell morphology:
a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxin
of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*
Infect. Immun. 10, 320-327 (1974)
- Guerrant, R.L., M.D. Dickens, R.P. Wenzel, and A.Z. Kapikian:
Toxigenic bacterial diarrhea: Nursery outbreak involving
multiple bacterial strains.
J. Pediat. 89, 885-891 (1976)
- Guerrant, R.L., J.M. Hughes, B. Chang, D.C. Robertson,
and F. Murad: Activation of intestinal guanylate
cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia*
coli: studies of tissue specificity, potential receptors
and intermediates.
J. Infect. Dis. 142, 220-228 (1980)
- Guinée, P.A.M., and J. Valkenburg: *Salmonellae* isolations
in the Netherlands, 1966-1973
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 231, 97-107 (1975)
- Guinée, P.A.M., and W.H. Jansen: Detection of enterotoxi-
genicity and attachment factors in *Escherichia coli*
strains of human, porcine and bovine origin: a
comparative study.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 245-257 (1979)
- Gurwith, M.J., and T.W. Williams: Gastroenteritis in children:
a two-year review in Manitoba I. Etiology.
J. Infect. Dis. 136, 239-247 (1977)
- Gyles, C.L., and D.A. Barnum: A heat-labile enterotoxin
from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic
for pigs.
J. Infect. Dis. 120, 419-426 (1969)
- Gyles, C.L.: Immunological study of the heat-labile
enterotoxin of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*.
Infect. Immun. 9, 564-570 (1974)
- Gyles, C., M. So, and S. Falkow: The enterotoxin plasmids
of *Escherichia coli*.
J. Infect. Dis. 130, 40-49 (1974)

- Henriqueta, M., L. Reis, A.F.P. Castro, M.R.F. Toledo,
and L.R. Trabulsi: Production of heat-stable
enterotoxin by the O 128 serogroup of *Escherichia*
coli.
Infect. Immun. 24, 289-290 (1979)
- Heyningen, S. van: The subunits of cholera toxin: structure,
stoichiometry and function.
J. Infect. Dis. 133, S5-S13 (1976)
- Hoekstra, D., J.W. Van der Laan, L. de Leig, and B. Wilholt:
Release of outer membrane fragments from normally
growing *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Acta 455, 889-899 (1976)
- Holmgren, J., O. Söderlind, and T. Wadström: Cross-reactivity
between heat-labile enterotoxins of *Vibrio cholerae*
and *Escherichia coli* in neutralization tests in rabbit
ileum and skin.
Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 81, 757-762 (1973)
- Holmgren, J., and A.M. Svennerholm: Enzyme-linked immuno-
sorbent assays for cholera serology.
Infect. Immun. 7, 759-763 (1973)
- Honda, T., M. Shimizu, Y. Takeda, and T. Miwatani: Isolation
of a factor causing morphological changes of Chinese
hamster ovary cells from the culture filtrate of
Vibrio parahaemolyticus.
Infect. Immun. 14, 1028-1033 (1976)
- Honda, T., S. Taga, Y. Takeda, and T. Miwatani: Modified
Elek test for detection of heat-labile enterotoxin
of enterotoxigenic *Escherichia coli*.
J. Clin. Microbiol. 13, 1-5 (1981)
- Hughes, J.M., F. Murad, B. Chang, and R.L. Guerrant:
Role of cyclic GMP in the action of heat-stable
enterotoxin of *Escherichia coli*.
Natur 271, 755-756 (1978)
- Jacks, T.M., B.J. Wu, A.C. Braemer, and D.E. Bidlack:
Properties of the enterotoxic component in
Escherichia coli enteropathogenic for swine.
Infect. Immun. 7, 178-189 (1973)

- Jacks, T.M., and B.J. Wu: Biochemical properties of *Escherichia coli* low-molecular-weight, heat-stable enterotoxin.
Infect. Immun. 9, 342-347 (1974)
- Jiwa, S.F.H.: Probing for enterotoxigenicity among *Salmonellae*: an evaluation of biological assays.
J. Clin. Microbiol. 14, 463-472 (1981)
- Josse, M., E. Jacquemin, and A. Kaeckenbeeck: Presence in dogs of *Escherichia coli* producing thermostable enterotoxin (STa). Their sensitivity to antibiotics.
Annales de Médecine Vétérinaire 124, 211-214 (1980)
- Kapitany, R.A., A. Scoot, G.W. Forsyth, S.L. McKenzie, and R.W. Worthington: Evidence of two heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 24, 965-966 (1979a)
- Kapitany, R.A., G.W. Forsyth, A. Scott, S.F. McKenzie, and R.W. Worthington: Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxins produced by bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 26, 173-177 (1979b)
- Kapperud, G., B.P. Berdal, and T. Omland: Enterotoxin production by *Yersinia enterocolitica*-like microbes at 22°C and 37°C.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 88, 65-67 (1980c).
- Kapperud, G.: Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. 1. Enterotoxin production at 22°C and 37°C by environmental and human isolates from Scandinavia.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 88, 287-291 (1980a)
- Kapperud, G.: Studies on the Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. 2. Interaction with HeLa cells among environmental and human isolates from Scandinavia.
Acta Path. Microbiol. Scand. B, 88, 293-297 (1980b)

- Kapperud, G., and G. Langeland: Enterotoxin production at refrigeration temperature by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. *Current Microbiol.* 5, 119 (1981)
- Keusch, G.T., G.F. Grady, and L.J. Mata: The pathogenesis of *Shigella* diarrhea. I. Enterotoxin produced by *Shigella dysenteriae*. *J. Clin. Invest.* 51, 1212-1218 (1972)
- Keusch, G.T., and T. Donata: Classification of enterotoxins on the basis of activity in cell culture. *J. Infect. Dis.* 131, 58-63 (1975)
- Klipstein, F.A., and R.F. Engert: Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. III. Preliminary characterization of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin. *J. Infect. Dis.* 132, 200-203 (1975)
- Klipstein, F.A., and E.A. Schenk: Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. II. Effect of the bacteria and their enterotoxins on intestinal structure. *Gastroenterology* 68, 642-655 (1975)
- Klipstein, F.A., J.R. Horowitz, R.F. Engert, and E.A. Schenk: Effect of *Klebsiella pneumoniae* enterotoxin on intestinal transport in the rat. *J. Clin. Invest.* 56, 799-807 (1975)
- Klipstein, F.A., and R.F. Engert: Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 13, 373-381 (1976a)
- Klipstein, F.A., C.S. Lee, and R.F. Engert: Assay of *Escherichia coli* enterotoxins by in vivo perfusion in the rat jejunum. *Infect. Immun.* 14, 1004-1010 (1976)
- Klipstein, F.A., and R.F. Engert: Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 14, 1307-1314 (1976b)
- Klipstein, F.A., R.F. Engert, and H.B. Short: Relative enterotoxigenicity of coliform bacteria. *J. Infect. Dis.* 136, 205-215 (1977)

- Klipstein, F.A., R.L. Guerrant, J.C. Wells, H.B. Short,
and R.F. Engert: Comparison of assay of coliform
enterotoxins by conventional techniques versus in
vivo intestinal perfusion.
Infect. Immun. 25, 146-152 (1979)
- Koupal, L.R., and R.H. Deibel: Assay, characterization, and
localization of an enterotoxin produced by *Salmonella*.
Infect. Immun. 11, 14-22 (1975)
- Kubota, Y., and P.V. Liu: An enterotoxin of *Pseudomonas*
aeruginosa.
J. Infect. Dis. 123, 97-98 (1971)
- Kühn, H., H. Ischäpe, and H. Rische: Enterotoxigenicity
among *Salmonellae* - a prospective analysis for a
surveillance programme.
Zbl. Bact. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.
Abt. I. Orig. A 240, 171-183 (1978)
- Kunkel, S.L., and D.C. Robertson: Factors affecting release
of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia*
coli.
Infect. Immun. 23, 652-659 (1979a)
- Kunkel, S.L., and D.C. Robertson: Purification and chemical
characterization of the heat-labile enterotoxin
produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 25, 586-596 (1979b)
- Lariviere, S., C.L. Gyles, and D.A. Barnum: Preliminary
characterization of the heat-stable enterotoxin of
Escherichia coli F 11 (P 155).
J. Infect. Dis. 128, 312-320 (1973)
- Leicht, G.J., M.E. Wert, and W. Burrows: Experimental cholera
in the rabbit ligated ileal loop: toxin induced water
and ion movement.
J. Infect. Dis. 116, 303-312 (1966)
- Ljungh, A., M. Popoff, and T. Wadström: *Aeromonas hydrophila*
in acute diarrheal disease: detection of enterotoxin
and biotyping of strains.
J. Clin. Microbiol. 6, 96-100 (1977)

- Madsen, G.L., and F.C. Knoop: Physiochemical properties of a heat-stable enterotoxin produced by *Escherichia coli* of human origin.
Infect. Immun. 28, 1051-1053 (1980)
- McIver, J., G.F. Grady, and G.T. Keusch: Production and characterization of exotoxin(s) of *Shigella dysenteriae* type 1.
J. Infect. Dis. 131, 559-566 (1975)
- Mashiter, K., G.D. Mashiter, R.L. Haugher, and J.B. Field: Effects of cholera and *Escherichia coli* enterotoxins on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and intermediary metabolism in the thyroid.
Endocrinology 92, 541-549 (1973)
- Merson, M.H., G.K. Morris, D.A. Sack, J.G. Wells, J.C. Feeley, R.B. Sack, W.B. Creech, A.Z. Kapikian, and E.J. Gangarosa: Travellers' diarrhea in Mexico. A prospective study of physicians and family members attending a congress.
N. Eng. J. Med. 294, 1299-1305 (1976)
- Merson, M.H., R.H. Yolken, R.B. Sack, J.L. Froelich, H.B. Greenberg, J. Hug, and R.W. Black: Detection of *Escherichia coli* enterotoxins in stools.
Infect. Immun. 29, 108-113 (1980)
- Metz, H., and J. Ohgke: Zur darmwirksamen toxischen Komponente des Kulturfiltrates enteropathogener Colibakterien.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 235, 53-55 (1976)
- Moon, H.W., S.C. Whipp, G.W. Engström, and A.L. Baetz: Response of the rabbit ileal loop to cell free products from *Escherichia coli* enteropathogenic for swine.
J. Infect. Dis. 121, 182-187 (1970)
- Moon, H.W., and S. Whipp: Development of resistance with age by swine enteropathogenic *Escherichia coli*.
J. Infect. Dis. 122, 220-223 (1970)
- Moon, H.W., P.Y. Fung, S.C. Whipp, and R.E. Isaacson: Effects of age and ambient temperature on the response of infant mice to heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: assay modifications.
Infect. Immun. 20, 36-39 (1978)

- Moon, H.W., E.M. Kohler, R.A. Schneider, and S.C. Whipp:
Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types, and
enteropathogenicity among K 88-negative enterotoxigenic
Escherichia coli from neonatal pigs.
Infect. Immun. 27, 222-230 (1980)
- Müller, H.E.: Über das unterschiedliche pathogenetische
Verhalten in 171 *Salmonella*-Serotypen aufgrund ihres
Vorkommens in Futtermitteln, Nutztieren und beim Menschen.
Infection 6, 121-129 (1978)
- Myers, L.L., F.S. Newman, G.R. Warren, J.E. Catlin, and
C.K. Anderson: Calf ligated intestinal segment test
to detect enterotoxigenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 11, 588-591 (1975)
- Myers, L.L., and P.A.M. Guinée: Occurrence and characteristics
of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from
calves with diarrhea.
Infect. Immun. 13 1117-1119 (1976)
- Nalin, D.R., A.K. Bhattacharjee, and S.H. Richardson:
Cholera-like toxic effect of culture filtrates of
Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 130, 595-601 (1974)
- Nalin, D.R., M.M. Lavien, C.R. Young, E.J. Berquist, and
J.C. McLaughlin: Increased *Escherichia coli* detection
after concentration culture supernatants: possible
new enterotoxin detectable in dogs but not in mice.
J. Clin. Microbiol. 8, 700-703 (1978)
- Neu, H.C., D.E. Cherubin, E.D. Longo, B. Flouton, and
J. Winter: Antimicrobial resistance and
R-factor transfer among isolates of *Salmonella* in the
northeastern United States: a comparison of human and
animal isolates.
J. Infect. Dis. 132, 617-622 (1975)
- Newsome, P.M., M.N. Burgess, and N.A. Mullan: Effect of
Escherichia coli heat-stable enterotoxin on cyclic
GMP levels in mouse intestine.
Infect. Immun. 22, 290-291 (1978)

Nunes, M.P., and J.D. Ricciardi: Detection of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay.

J. Clin. Microbiol. 13, 783-786 (1981)

Okamoto, K., T. Inoue, H. Ichikawa, Y. Kawamoto, and Miyama: Partial purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. 31, 554-559 (1981)

Olsson, E., and O. Söderlind: Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains.

J. Clin. Microbiol. 11, 6-15 (1980)

Olsson, E., K. Krovacek, B. Hurrel, and T. Wadström: Enterotoxigenic porcine and human isolates of *Yersinia enterocolitica* in Sweden.

Current Microbiology 3, 267-271 (1980)

Pai, C.H., and V. Mors: Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. 19, 908-911 (1978)

Pai, C.H., V. Mors, and S. Toma: Prevalence of enterotoxigenicity in human and non-human isolates of *Yersinia enterocolitica*.

Infect. Immun. 22, 334-338 (1978)

Pandey, P.N., D.C. Thapliyal, and S.N. Sharma: Enterotoxigenicity of some *Escherichia coli* isolates.

Indian J. of Animal Res. 13, 1-4 (1979)

Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapeutika, e.V.,

Arbeitsgemeinschaft "Resistenz", 1978:

Empfindlichkeit klinischer Isolate einiger Enterobacteriaceae sowie von *Pseudomonas aeruginosa*.

Staphylococcus aureus und *Streptococcus faecalis* gegen-
über Chemotherapeutika.

Infection, 6, 35-44 (1978)

Pesti, L.: *Escherichia coli* infection in piglets.

Fortschritte der Vet.-Med. 29, 33-51 (1979)

- Pietzsch, O.: Salmonelloseüberwachung. Verbreitung der Salmonella-Infektionen bei Tieren, tierischen Lebens- und Futtermitteln in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West). Jahresberichte 1975 und 1976 Bundesgesundhsbl. 21, 389-411 (1978)
- Pietzsch, O.: Salmonellose-Überwachung in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West). Jahresberichte 1978 und 1979. Bundesgesundhsbl. 24, 410-412 (1981)
- Polotsky, Y.E., E.M. Dragunskaya, V.G. Seliverstova, T.A. Avdeeva, M.G. Chakhutinskaya, J. Kátyi, A. Vertényi, B. Ralovich, L. Emody, J. Málovies, N.V. Safonova, E.S. Snigireoskaya, and E.J. Karyagina: Pathogenic effect of enterotoxigenic Escherichia coli and Escherichia coli causing infantile diarrhoea. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 24, 221-236 (1977)
- Rao, M.C., S. Guandalini, W.J. Laird, and M. Field: Effects of heat-stable enterotoxin of Yersinia enterocolitica on ion transport and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate metabolism in rabbit ileum. Infect. Immun. 26, 875-878 (1979)
- Renault, L., D. Mathieu, E. Le Bourhis: Detecting enteropathogenic strains of Escherichia coli of porcine origin. 2. Relationship between O and K antigens and the production of enterotoxin in strains isolated from the piglet after weaning. Annales de Recherches Vétérinaires 9, 427-432 (1978)
- Robins-Brown, R.M., C.S. Still, M.D. Milotis, and H.J. Koornhof: Mechanism of action of Yersinia enterocolitica enterotoxin. Infect. Immun. 25, 680-684 (1979)
- Rudoy, R.C., and J.D. Nelson: Enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli occurrence in acute diarrhea of infants and children. Am. J. Dis. Child 129, 668 (1975)
- Ryder, R.W., P.A. Blake, A.C. Murlin, G.P. Carter, R.A. Pollard, M.H. Merson, S.D. Allen, and D.J. Brenner: Epidemiology. Increase in antibiotic resistance among isolates of Salmonella in the United States 1967-1975 J. Infect. Dis. 142, 485-491 (1980)

- Sack, R.B., and C.C.J. Carpenter: Experimental canine cholera II. Production by cell free culture filtrates of *Vibrio cholerae*.
J. Infect. Dis. 119, 150-157 (1969)
- Sack, D.A., and R.B. Sack: Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cells in miniculture.
Infect. Immun. 11, 334-336 (1975)
- Sack, R.B., D.A. Sack, I.J. Mehlman, F. Orskov, and I. Orskov: Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food.
J. Infect. Dis. 135, 313-317 (1977)
- Sack, R.B.: The epidemiology of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*.
J. Infect. Dis. 137, 639-640 (1978)
- Sack, R.B.: Medical perspective. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Identification and characterization.
J. Infect. Dis. 142, 279-286 (1980)
- Sakazaki, R., K. Tamura, A. Nakamura: Enteropathogenic and enterotoxigenic activities on ligated gut loops in rabbits of *Salmonella* and some other enterobacteria isolated from human patients with diarrhea.
Jpn. J. Sci. Biol 27, 45-48 (1974)
- Sandefur, P.D., and J.W. Peterson: Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*.
Infect. Immun. 14, 671-679 (1976)
- Sandefur, P.D., and J.W. Peterson: Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin.
Infect. Immun. 15, 988-992 (1977)
- Sandsted, K., A. Gunnarson, B. Hurvell, B. Nordblom, L. Rutquist, and O. Söderlind: *Salmonellae* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1973-1977.
Nord. Vet. Med. 32, 57 (1980)
- Sanyal, S.C., S.J. Singh, and P.C. Sen: Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*.
J. Med. Microbiol. 8, 195-198 (1975)

- Schenkein, J., R.F. Green, D.S. Santos, and W.K. Maas:
Partial purification and characterization of
a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 13, 1710-1720 (1976)
- Sedlock, D.M., and R.H. Deibel: Detection of *Salmonella*
enterotoxin using rabbit ileal loops.
Can. J. Microbiol. 24, 268-273 (1978)
- Sedlock, D.M., L.R. Koupal, and R.H. Deibel: Production
and partial purification of *Salmonella* enterotoxin
Infect. Immun. 20, 375-380 (1978)
- Sivasuamy, G., and C.L. Gyles: Characterization of entero-
toxicogenic bovine *Escherichia coli*.
Can. J. Comp. Med. 40, 247-251 (1976)
- Skerman, F.J., S.B. Formal, and S. Falkow: Plasmid-associated
enterotoxin production in a strain of *Escherichia coli*
isolated from humans.
Infect. Immun. 5, 622-624 (1972)
- Smith, H.W., and S. Halls: Observations by the ligated intestinal
segment and oral inoculation method on *Escherichia*
coli infections in pigs, calves, lambs, and rabbits.
J. Path. Bact. 93, 499-529 (1967a)
- Smith, H.W., and S. Halls: Studies of *Escherichia coli*
enterotoxin.
J. Path. Bact. 93, 531-543 (1967b)
- Smith, H.W., and C.L. Gyles: The effect of cell free fluids
prepared from cultures of human and animal enteropatho-
genic strains of *Escherichia coli* on ligated intestinal
segments of rabbits and pigs.
J. Med. Microbiol. 3, 403-409 (1970)
- Smith, H.W., and H. Williams: The enterotoxin and other
plasmids of enteropathogenic *Escherichia coli*
Vet. Sci. Communications 1, 213-224 (1977)
- Smith, B.P., F. Habasha, M. Reina-Guerra, and A.J. Hardy:
Bovine Salmonellosis: Experimental production and
characterization of the disease in calves, using oral
challenge with *Salmonella typhimurium*.
Am. J. Vet. Res. 40, 1510-1513 (1979)

- Söderlind, O., and R. Möllby: Enterotoxins, O - groups.
and K 88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal
piglets with and without diarrhea.
Infect. Immun. 24, 611-616 (1979)
- Sojka, W.J., E.B. Hudson, and G. Slavin: A survey of drug
resistance in *Salmonellae* isolated from animals in
England and Wales during 1971
Br. vet. J. 130, 128-138 (1974)
- Sojka, W.J., C. Wray, E.B. Hudson, and J.A. Benson:
Incidence of *Salmonella* infection in animals in
England and Wales 1968-1973.
Vet. Rec. 96, 280 (1975)
- Sojka, W.J., and C. Wray: A survey of drug resistance in
Salmonellae isolated from animals in England and
Wales from 1975 to 1978.
Br. vet. J. 136, 463-477 (1980)
- Speirs, J.I., S. Stavric, and J. Konowalchuk: Assay of
Escherichia coli heat-labile enterotoxin with Vero
cells.
Infect. Immun. 16, 617-622 (1977)
- Stephan, R. und E. Bulling: Die Entwicklung der Antibio-
tikaresistenz von *Salmonellabakterien* tierischer
Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland einschl.
Berlin (West).
2. Mitteilung: Jahresbericht 1971
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 225, 257-262 (1973)
- Stephan, R., E. Bulling and A. Steinbeck: Die Entwicklung
der Antibiotikaresistenz von *Salmonellabakterien*
tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland
einschl. Berlin (West). 3. Mitteilung: Jahresbericht 1972
Zbl. Bakt. Hyg, I. Abt. Orig. A 234, 29- 36 (1976)
- Stephan, R., E. Bulling und A. Steinbeck: Die Entwicklung
der Antibiotikaresistenz von *Salmonellabakterien*
tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland
einschl. Berlin (West). 4. Mitteilung: Jahresbericht 1973
Zbl. Bakt. Hyg, I. Abt. Orig. A 234, 37-45 (1976)

- Stephan, R., E. Bulling und A. Steinbeck: Die Entwicklung der Antibiotikaresistenz von Salmonellabakterien tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West). 5. Mitteilung: Jahresbericht 1974 Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig, A 237, 254-263 (1977)
- Stephan, R., E. Bulling und A. Steinbeck: Die Entwicklung der Antibiotikaresistenz von Salmonellabakterien tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West). 6. Mitteilung: Jahresbericht 1975 Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 237, 264-273 (1977)
- Stieglitz, H., R. Fonseca, J. Olarte, and Y.M. Kupersztochportnoy: Linkage of heat-stable enterotoxin activity and ampicillin resistance in a plasmid isolated from an Escherichia coli strain of human origin. Infect. Immun. 30, 617-620 (1980)
- Takeda, Y., K. Okamoto, and T. Miwatani: Toxin from the culture filtrate of Shigella dysenteriae that causes morphological changes in CHO cells is distinct from the neurotoxin. Infect. Immun. 18, 546-548 (1977)
- Takeda, T., Y. Takeda, T. Miwatani, and N. Ohtomo: Detection of cholera enterotoxin activity in suckling hamster. Infect. Immun. 19, 752-754 (1978)
- Takeda, T., T. Honda, Y. Takeda, and T. Miwatani: Failure of chlorpromazine to inhibit fluid accumulation caused by Escherichia coli heat-stable enterotoxin in suckling mice. Infect. Immun. 32, 480-483 (1981)
- Taylor, J., and M.P. Wilkins: The effect of Salmonella and Shigella on ligated loops of rabbit gut. Indian J. Med. Res. 49, 544-549 (1961)
- Thelestam, M.: Evaluation of cell cultures as test systems for the detection of enterotoxin-forming Escherichia coli which cause diarrhea. Svensk Veterinärtidning 30, 711-712 (1978)
- Tsukamoto, T., Y. Kiuoshita, S. Taga, Y. Takeda, and T. Miwatani: Value of passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol 12, 768-771 (1980)

- Vasil, M.L., R.K. Holmes, and R.A. Finkelstein: Conjugal transfer of a chromosomal gene determining production of enterotoxin in *Vibrio cholerae*.
Science 187, 849-850 (1975)
- Vaughan, M., N.F. Pierce, and W.B. Greenough III.: Stimulation of glycerol production in fat cells by cholera toxin
Nature 226, 658-659 (1970)
- Violle, H., and Crendiropoulos: Note sur le choléra expérimental
C.R. Soc. Biol. 78, 331-332 (1915)
- Wadström, T.: Relative importance of enterotoxigenic and invasive enteropathogenic bacteria in infantile diarrhea.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 242, 52-62 (1978)
- Whipp, S.C., H.W. Moon, and N.C. Lyon: Heat-stable *Escherichia coli* production in vivo.
Infect. Immun. 12, 240-244 (1975)
- Volken, R.H., H.B. Greenberg, M.H. Merson, R.B. Sack, and A.Z. Kapikian: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin.
J. Clin. Microbiol. 6, 439-444 (1977)
- Zenser, T.V., and J.F. Metzger: Comparison of the action of *Escherichia coli* enterotoxin on the thymocyte adenylate cyclase-cyclic adenosin monophosphate system to that of cholera toxin and prostaglandin E1.
Infect. Immun. 10, 503-509 (1974)

Herrn Professor Dr. DDr. h.c. A. Mayr und Herrn Professor Dr. G. Beck danke ich für die Überlassung des Themas und die gebotenen Möglichkeiten zur Durchführung der Arbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Professor Dr. H.H. Bethcke sowie Herrn Veterinärdirektor Dr. B. Fiegl und allen Mitarbeitern an der Bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle des Schlachthofes München für die jederzeit großzügig gewährte Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. G. Baljer für seine hilfreichen praktischen und technischen Hinweise und die freundlich gewährte Betreuung.

Ein herzliches "Danke schön" allen Mitarbeitern des Instituts, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten.

Lebenslauf

Geboren: am 21. März 1952 in Kötzing
Vater: Johann Fischer
Mutter: Margarete Fischer
geborene Petermann
Volksschule: von 1958 bis 1963
Gymnasium: von 1963 bis 1970 am Augustinus-
Gymnasium in Weiden,
von 1970 bis 1973 am Robert-
Schuman-Gymnasium in Cham
(abgeschlossen mit dem Abitur
am 8. Juni 1973)
Wehrpflicht: vom 2. Juli 1973 bis 30. September 1974
Studium: vom Wintersemester 1974/75 bis
zum Wintersemester 1979/80 an
der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München (abgeschlossen
mit dem Staatsexamen am 22. Januar 1980)
Approbation als Tierarzt: am 14. März 1980

